
MASTERARBEIT

Frau B. Sc.
Susanne Klemm

Nachweis von β -Lactamasen in gramnegativen Bakterien

Mittweida, 2012

MASTERARBEIT

Nachweis von β -Lactamasen in gramnegativen Bakterien

Autorin:

Frau B. Sc.

Susanne Klemm

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

MO10w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Dr. rer. nat. Simone Geyer

Einreichung:

Mittweida, 24.08.2012

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2012

MASTERTHESIS

Detection of β -lactamases in gram-negative bacteria

author:

Ms. B. Sc.

Susanne Klemm

course of studies:

Molecular Biology/Bioinformatics

seminar group:

MO10w1-M

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

second examiner:

Dr. rer. nat. Simone Geyer

submission:

Mittweida, 24.08.2012

defence/evaluation:

Mittweida, 2012

Bibliografische Beschreibung:

Klemm, Susanne:

Nachweis von β -Lactamasen in gramnegativen Bakterien. - IX, 71, XL S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Masterarbeit, 2012

Referat:

Der schnelle und sichere Nachweis von multiresistenten gramnegativen Bakterien ist eine Voraussetzung, um deren Ausbreitung einzudämmen. Die Untersuchung verschiedener mikrobiologischer Methoden zum Nachweis von β -Lactamasen, insbesondere ESBLs und Carbapenemasen, erfolgte beispielhaft an den gramnegativen Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. und *Pseudomonas aeruginosa*. Die als Grundlage für die Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmungen dienenden Breakpoints werden sowohl von der CLSI als auch von der EUCAST festgelegt. Jedoch sind nur im aktuellen Normensystem der CLSI Kriterien zum Nachweis von ESBLs und Carbapenemasen angegeben. Der über die Automatenysteme durchgeführte ESBL-Bestätigungstest hat eine ausreichend hohe Spezifität und Sensitivität für *K. pneumoniae*. Hingegen ist bei *K. oxytoca* und *Enterobacter* spp. der DD-Synergietest zum Nachweis von ESBL-Bildung erforderlich. Auch wenn nach einer neuen Empfehlung die gramnegativen Bakterien anhand von Leitsubstanzen in MRGNE und nicht-MRGNE eingeteilt werden, bleiben die ESBL-Bestätigungstests weiterhin sinnvoll, denn Fluorchinolon- und Carbapenem-sensible ESBL-Bildner würden nicht als MRGNE eingestuft werden. Bei Carbapenemase-Verdacht steht der modifizierte Hodge-Test zum Nachweis von Carbapenemase-Aktivität zur Verfügung. Dieser sollte bei *Enterobacteriaceae* mit Meropenem und bei nicht-*Enterobacteriaceae* mit Imipenem durchgeführt werden. Eine nähere Spezifizierung der Carbapenemase kann mit verschiedenen Zusatztests, wie dem MBL-Etest oder dem KPC/MBL Identifikations-Kit, erfolgen.

Bibliographic description:

Klemm, Susanne:

Detection of β -lactamases in gram-negative bacteria. - IX, 71, XL pp.

Mittweida, University of Applied Sciences,

Faculty Mathematics/Sciences/Computer Science

Masterthesis, 2012

Abstract:

The rapid and reliable detection of multiresistant gram-negative bacteria is of utmost importance to inhibit their spread. Different microbiological methods for the detection of β -lactamases, especially ESBLs and carbapenemases, were analyzed by using the gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. Breakpoints for antimicrobial susceptibility testing are defined by CLSI and by EUCAST. However, only CLSI determined standards for the detection of ESBLs and carbapenemases. The automated ESBL confirmation test shows high specificity and sensitivity for *K. pneumoniae*, whereas other *Enterobacteriaceae* should be tested with the double-disk synergy test. Additional confirmatory tests for ESBLs remain necessary, even if the gram-negative bacteria are grouped in MRGNE and not-MRGNE due to their susceptibility to lead antibiotics. This is due to the fact that ESBL-producing bacteria, which are susceptible to fluoroquinolones and carbapenems, would not be classified as MRGNE. The MHT allows for the detection of carbapenemase production, particularly in gram-negative bacteria with increased MICs to carbapenems. It should be performed employing meropenem for *Enterobacteriaceae* and imipenem for non-*Enterobacteriaceae*. A more specific characterization of the carbapenemase can be obtained by the MBL-Etest and the KPC/MBL Confirmation kit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.1.1 <i>Enterobacter</i> spp.	2
1.1.2 <i>Klebsiella</i> spp.	2
1.2 Nicht- <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.2.1 <i>Acinetobacter</i> spp.	3
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.3 β -Lactamasen und ihr Wirkungsspektrum	5
1.3.1 ESBL	6
1.3.2 AmpC	7
1.3.3 Carbapenemasen	7
1.4 Die Normensysteme von CLSI und EUCAST	9
1.5 Klassifizierung gramnegativer Bakterien	10
2 Material	12
2.1 Geräte und Zubehör	12
2.2 Antibiotika-Testblättchen und -Teststreifen	13
2.3 Nährmedien	13
2.4 Chemikalien	14
2.5 Bakterienstämme	14
2.6 Software	15
3 Methode	16
3.1 Stammsammlung und Stammpflege	17
3.2 Keimidentifizierung über MALDI-TOF MS	17

3.3	Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung	18
3.3.1	Erstellung von Antibiogrammen mit dem VITEK 2-System	18
3.3.2	Erstellung von Antibiogrammen mit dem WalkAway	18
3.4	Nachweis von β -Lactamasen	19
3.4.1	ESBL-Bestätigungstests	19
3.4.2	Modifizierter Hodge-Test	20
3.4.3	MBL-Etest	21
3.4.4	KPC/MBL-Bestätigungstest	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Vergleich der Normen von CLSI und EUCAST	24
4.1.1	Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung	24
4.2	Klassifizierung gramnegativer Bakterien	29
4.2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
4.2.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	31
4.2.3	<i>Enterobacter cloacae</i>	32
4.2.4	<i>Acinetobacter</i> spp.	33
4.2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
4.3	Nachweis der Resistenzmechanismen	35
4.3.1	<i>Klebsiella</i> spp.	38
4.3.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	40
4.3.3	<i>Acinetobacter</i> spp.	42
4.3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
5	Diskussion	45
5.1	Methoden zum Nachweis von β -Lactamasen	45
5.1.1	ESBL-Nachweis	45
5.1.2	Carbapenemase-Nachweis	47
5.2	Vorschlag zur Diagnostik gramnegativer Bakterien	51
5.3	Klassifizierung gramnegativer Bakterien unter Verwendung der CLSI-Norm	54
5.3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
5.3.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	56
5.3.3	<i>Enterobacter cloacae</i>	56
5.3.4	<i>Acinetobacter</i> spp.	57
5.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
5.4	CLSI versus EUCAST	59
6	Fazit und Ausblick	62

Literaturverzeichnis	63
Anlagen	70
Anlagen, Teil 1	A-I
Anlagen, Teil 2	A-V
Anlagen, Teil 3	A-VI
Anlagen, Teil 4	A-VII
Anlagen, Teil 5	A-VIII
Anlagen, Teil 6	A-IX
Anlagen, Teil 7	A-X
Anlagen, Teil 8	A-XI
Anlagen, Teil 9	A-XII
Anlagen, Teil 10	A-XIV
Anlagen, Teil 11	A-XV
Anlagen, Teil 12	A-XVI
Anlagen, Teil 13	A-XVII
Anlagen, Teil 14	A-XIX
Anlagen, Teil 15	A-XX
Anlagen, Teil 16	A-XXI
Anlagen, Teil 17	A-XXII
Anlagen, Teil 18	A-XXIII
Anlagen, Teil 19	A-XXIV

Anlagen, Teil 20.....	A-XXVII
Anlagen, Teil 21.....	A-XXVIII
Anlagen, Teil 22.....	A-XXIX
Anlagen, Teil 23.....	A-XXX
Anlagen, Teil 24.....	A-XXXI
Anlagen, Teil 25.....	A-XXXII
Anlagen, Teil 26.....	A-XXXIII
Anlagen, Teil 27.....	A-XXXIV
Anlagen, Teil 28.....	A-XXXV
Anlagen, Teil 29.....	A-XXXVI
Anlagen, Teil 30.....	A-XXXVII
Anlagen, Teil 31.....	A-XXXVIII
Anlagen, Teil 32.....	A-XL
Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Auswertung des modifizierten Hodge-Tests	21
Abbildung 3.2: Auswertung des KPC/MBL-Bestätigungstests	23
Abbildung 4.1: Klassifizierung der <i>Klebsiella pneumoniae</i> -Stämme	30
Abbildung 4.2: Klassifizierung der <i>Klebsiella oxytoca</i> -Stämme	31
Abbildung 4.3: Klassifizierung der <i>Enterobacter cloacae</i> -Stämme	32
Abbildung 4.4: Klassifizierung der <i>Acinetobacter</i> -Stämme.	33
Abbildung 4.5: Klassifizierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stämme	34
Abbildung 5.1: Arbeitsablauf der <i>Enterobacteriaceae</i> -Diagnostik.....	52
Abbildung 5.2: Carbapenemase-Diagnostik bei <i>Acinetobacter</i> spp. und <i>P. aeruginosa</i>	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Einteilung der β -Lactam-Antibiotika	5
Tabelle 1.2: Molekulare Klassifizierung der β -Lactamasen nach Ambler	6
Tabelle 2.1: Geräte und Zubehör	12
Tabelle 2.2: Antibiotika-Testblättchen und -Teststreifen	13
Tabelle 2.3: Nährmedien	13
Tabelle 2.4: Chemikalien	14
Tabelle 2.5: ATCC-Referenzstämme	14
Tabelle 2.6: Stämme mit molekularbiologisch bestätigtem Resistenzmechanismus	14
Tabelle 2.7: Software	15
Tabelle 3.1: Auswertung des KPC/MBL-Bestätigungstests	23
Tabelle 4.1: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für <i>Enterobacteriaceae</i>	25
Tabelle 4.2: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für <i>Acinetobacter</i> spp.	26
Tabelle 4.3: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	27
Tabelle 4.4: Auswahlkriterien für die Durchführung der Bestätigungstests	35
Tabelle 4.5: Antibiotika-Empfindlichkeiten der analysierten Bakterienstämme	37
Tabelle 4.6: Testergebnisse der <i>Klebsiella</i> -Stämme	39
Tabelle 4.7: Testergebnisse der <i>Enterobacter cloacae</i> -Stämme	41
Tabelle 4.8: Testergebnisse der <i>Acinetobacter</i> -Stämme	42
Tabelle 4.9: Testergebnisse der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stämme	44
Tabelle 5.1: Einteilung der Bakterienstämme nach Mattner <i>et al.</i> , 2012	61

Abkürzungsverzeichnis

ADC	<i>Acinetobacter</i> -derived Cephalosporinase (von <i>Acinetobacter</i> abgeleitete Cephalosporinase)
AmpC	β -Lactamase vom Typ AmpC
ATCC	American Type Culture Collection (amerikanische Stammsammlung)
BES	ESBL vom Typ BES
BO	Borsäure
CARB	Carbapeneme
CAZ	Ceftazidim
CEPH	Cephalosporine
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut für klinische und Labor-Standards)
COS-Agar	Columbia-Agar + 5% Schafblut
CPD	Cefpodoxim
CTX	Cefotaxim
CTX-M	ESBL vom Typ CTX-M
CV	Clavulansäure
CX	Cloxacillin
DD-Synergietest	Doppeldisk-Synergietest
DP	Dipicolinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamase (β -Lactamase mit erweitertem Wirkungsspektrum)
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Enterobacter</i> spp.
ETP	Ertapenem
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Europäisches Komitee für antimikrobielle Empfindlichkeitsbestimmung)

FC	Fluorchinolone
FOX	Cefoxitin
GIM	Metallo- β -Lactamase vom Typ GIM
ID	Identifikation
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMP	Metallo- β -Lactamase vom Typ IMP
IMI	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
K1	β -Lactamase in <i>Klebsiella oxytoca</i>
L-1	Metallo- β -Lactamase in <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight – Mass Spectrometry (matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation - Flugzeit - Massenspektrometrie)
MBL	Metallo- β -Lactamase
MCK-Agar	Mac Conkey-Agar
MERO	Meropenem
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHT	Modifizierter Hodge-Test
MH2-Agar	Müller Hinton 2-Agar
MRP	Meropenem
NDM	New Dehli Metallo- β -Lactamase
NMC-A	Carbapenemase vom Typ NMC-A
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OprD	Porin der äußeren Zellmembran
OXA	Oxacillinase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PEA-MHT	Für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> optimierter modifizierter Hodge-Test
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft
PEN	Penicilline
PER	ESBL vom Typ PER

SHV	β -Lactamase vom Typ SHV
SIM	Metallo- β -Lactamase vom Typ SIM
SME	Carbapenemase vom Typ SME
TEM	β -Lactamase vom Typ TEM
V	VITEK 2-System
VEB	ESBL vom Typ VEB
VIM	Verona Integron-kodierte Metallo- β -Lactamase
W	WalkAway-System
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
3 MRGNE	Multiresistenter gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen
4 MRGNE	Multiresistenter gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen

1 Einleitung

Für die Weltgesundheitsorganisation WHO zählen die bakteriellen Antibiotika-resistenzen zu den größten Gefahren für die menschliche Gesundheit. Die am weitesten verbreiteten und schwerwiegendsten multiresistenten Bakterien werden als „ESKAPE“ zusammengefasst. „ESKAPE“ steht dabei für die grampositiven Kokken *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus* und die gramnegativen Stäbchenbakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp. [Howard et al., 2012].

Der vielseitige und zum Teil ungerichtete Therapieeinsatz von Antibiotika begünstigt unter anderem die Selektion multiresistenter Erreger, deren Ausbreitung zunehmend zur Einschränkung der noch wirksamen Wirkstoffklassen und somit zur Limitierung der Therapieoptionen führt. Von besonderer Bedeutung innerhalb der gramnegativen, multiresistenten Bakterien sind dabei ESBL (extended-spectrum β -lactamase)-produzierende und Carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas aeruginosa* [Kanj & Kanafani, 2011]. Weltweit ist ein zunehmendes Auftreten von Bakterienstämmen mit Bildung von ESBL, Carbapenemasen und Cephalosporinasen (plasmid-kodierte AmpC- β -Lactamasen) zu beobachten [Witte & Mielke, 2003]. Neben diesen β -Lactam-Resistenzen sind auch immer häufiger Chinolon-Resistenzen zu beobachten [Neumeister et al., 2009]. Eine kontinuierliche Weiterentwicklung der antimikrobiellen Wirkstoffe und die Verhinderung einer weiteren Ausbreitung der multiresistenten Bakterien sind daher unerlässlich, wobei dafür eine schnelle und zuverlässige Labordiagnostik sowie eine klare Definition und Klassifizierung dieser Erreger von grundlegender Bedeutung sind.

1.1 *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* umfasst gramnegative, fakultativ aerobe, sporenlose Stäbchenbakterien, die sowohl beweglich als auch unbeweglich sein können. Die meisten *Enterobacteriaceae* sind fakultativ, nur wenige obligat human-pathogen. Zu ihrem natürlichen Lebensraum zählen Boden-, Wasser- und Pflanzenhabitats. Außerdem sind sie Teil der menschlichen Darmflora [Neumeister et al., 2009].

Stellvertretend für die *Enterobacteriaceae* habe ich mich in meiner Arbeit auf die beiden Gattungen *Enterobacter* und *Klebsiella* konzentriert. Sie gehören zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen. So sind *Klebsiella* spp. bei 12,6% und *Enterobacter* spp. bei 8,6% der Fälle die Verursacher von Infektionen der unteren Atemwege auf Intensivstationen [Breier et al., 2009].

1.1.1 *Enterobacter* spp.

Bakterien der Gattung *Enterobacter* sind bewegliche, fakultativ pathogene *Enterobacteriaceae*. Sie treten als Umweltkeime auf, gehören aber auch zur physiologischen Bakterienflora des menschlichen Darmes [Hahn *et al.*, 1991]. Die Spezies *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* und *E. nimipressuralis* werden auf Grund ihrer biochemischen und molekularen Ähnlichkeit zu einem *Enterobacter cloacae*-Komplex zusammengefasst, wobei *E. cloacae* und *E. hormaechei* am häufigsten in klinischen Proben nachgewiesen werden [Mezzatesta *et al.*, 2012]. Sie können Verursacher verschiedener nosokomialer Infektionen sein, wie beispielsweise Pneumonien, Sepsis, Meningitis und Harnwegsinfektionen [Hahn *et al.*, 1991].

Bei der Behandlung von *Enterobacter*-Infektionen dienen Carbapeneme als Antibiotika der ersten Wahl. Chinolone werden alternativ eingesetzt [Wichelhaus, 2004/2005]. Hingegen sind Benzyl- und Aminopenicilline sowie Cephalosporine der ersten und zweiten Generation, wegen der natürlichen Resistenz gegenüber diesen Antibiotika, unwirksam [Neumeister *et al.*, 2009]. Zusätzlich besitzen *Enterobacter* spp. ein chromosomales, induzierbares *ampC*-Gen. Dieses kann unter einer Therapie mit Cephalosporinen der dritten Generation durch Mutation dereprimiert werden, wodurch die AmpC- β -Lactamase stabil überproduziert wird und die Cephalosporine der dritten Generation folglich nicht mehr wirksam sind [Wiegand, 2003].

1.1.2 *Klebsiella* spp.

Bakterien der Gattung *Klebsiella* sind eng mit der Gattung *Enterobacter* verwandt. Wie diese zählen sie zu den fakultativ humanpathogenen *Enterobacteriaceae*. Sie können, insbesondere im Bereich der Intensivpflege und bei künstlicher Beatmung, Sepsis, Harnwegs- und Atemwegsinfektionen hervorrufen. Im Gegensatz zu den *Enterobacter*-Arten sind sie nicht beweglich [Hahn *et al.*, 1991; Neumeister *et al.*, 2009].

Klebsiella spp. besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber den Amino- und Benzylpenicillinen [Neumeister *et al.*, 2009]. Die Cephalosporine der dritten Generation und die Chinolone dienen als Mittel der Wahl zur Behandlung von *Klebsiella*-Infektionen [Wichelhaus, 2004/2005]. Die Therapieoptionen werden jedoch oft durch den Erwerb zusätzlicher Resistenzen eingeschränkt. So gehören *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* neben *E. coli* zu den *Enterobacteriaceae*-Spezies, bei denen ESBL-Bildung am häufigsten nachgewiesen wird [Neumeister *et al.*, 2009]. ESBL-bildende *Klebsiella* spp. sind resistent gegenüber den meisten β -Lactam-Antibiotika, auch gegenüber den Cephalosporinen der dritten Generation [Pfeifer, 2007]. Bei *K. oxytoca* wird die Resistenz gegen Aminopenicilline, Ticarcillin und Piperacillin durch eine Low-Level-Produktion der chromosomal kodierten K1- β -Lactamase vermittelt. Durch Mutation in der Promotorregion des *k1*-Gens kann es zur Überproduktion der K1- β -Lactamase

kommen. K1-Überproduzenten zeigen ein ähnliches Resistenzspektrum wie ESBL-produzierende Stämme [Mammeri *et al.*, 2003; Pfeifer, 2007]. Bei ESBL-Bildnern bleiben als Therapieoption nur die Carbapeneme und Chinolone [Wichelhaus, 2004/2005]. Durch den Erwerb von Carbapenemase-Genen können die *Klebsiella*-Stämme jedoch auch eine Resistenz gegenüber den Carbapenemen erwerben. So werden in Deutschland über 80% der Carbapenemasen in *K. pneumoniae*-Stämmen detektiert, KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) und OXA-48 zählen dabei zu den häufigsten [Gatermann & Kaase, 2011].

1.2 Nicht-Enterobacteriaceae

1.2.1 *Acinetobacter* spp.

Bakterien der Gattung *Acinetobacter* sind aerobe, gramnegative, unbewegliche, nicht fermentierende, kokkoide Stäbchen [Howard *et al.*, 2012]. Sie sind ubiquitär verbreitet, in nahezu allen Boden- und Wasserproben nachweisbar und können auch Teil der menschlichen Hautflora sein [Neumeister *et al.*, 2009].

Als Erreger mit der größten humanmedizinischen Bedeutung gelten *A. baumannii*, *A. Genomospezies 3* und *Genomospezies 13TU*, wobei *A. baumannii*-Stämme beim Menschen am häufigsten isoliert werden [Wieczorek *et al.*, 2008]. Aber auch andere *Acinetobacter*-Spezies, wie *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. Iwoffii* und *A. ursingii*, konnten in klinischen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen werden [Neumeister *et al.*, 2009]. Wegen ihrer engen genetischen Verwandtschaft können *A. baumannii*, *A. Genomospezies 3* und *Genomospezies 13TU*, zusammen mit dem Umweltkeim *A. calcoaceticus*, zu einem *Acinetobacter-calcoaceticus*-Komplex zusammengefasst werden [Quinn, 1998; Howard *et al.*, 2012]. Sie können, vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten, verschiedene nosokomiale Infektionskrankheiten, wie beatmungsassoziierte Pneumonien, Harnwegsinfektionen und Katheter-assoziierte Bakteriämien, verursachen [Hahn *et al.*, 1991; Poirel & Nordmann, 2006]. *A. baumannii* ist innerhalb der Gattung *Acinetobacter* klinisch und epidemiologisch am bedeutsamsten und der häufigste Verursacher nosokomialer Infektionen [Coyne *et al.*, 2011; Mattner *et al.*, 2012]. Durch die hohe intrinsische Resistenz sind die Therapiemöglichkeiten bei *Acinetobacter*-Infektionen eingeschränkt. So sind *A. baumannii* resistent gegen Cephalosporine der ersten und zweiten Generation, gegen Penicilline und gegen Ertapenem, Trimethoprim, Fosfomycin und Cefoxitin. Aztreonam und Cephalosporine der dritten Generation sind klinisch meist nicht wirksam. Die Resistenz wird durch eine chromosomal kodierte, nicht induzierbare AmpC- β -Lactamase, eine Oxacillinase der Ambler-Klasse D (OXA-51 Gruppe) und durch eine gering permeable Zellmembran vermittelt [Neumeister *et al.*, 2009; Coyne *et al.*, 2011; Leclercq *et al.*, 2011; Howard *et al.*, 2012]. Zusätzlich können die *Acinetobacter*-Stämme weitere Resistenzmechanismen erwerben. Zu diesen gehören β -Lactamasen, verschiedene Efflux-

Mechanismen, Veränderungen der Proteine der äußeren Zellmembran und veränderte Bindungsstellen der Antibiotika-Zielproteine. Carbapeneme galten lange als letzte wirksame Antibiotika bei der Behandlung von schweren *Acinetobacter*-Infektionen. Derzeit kann jedoch weltweit eine steigende, durch verschiedene Carbapenemasen vermittelte Carbapenem-Resistenz beobachtet werden [Poirel & Nordmann, 2006; Huang J. *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2012].

Ihre Fähigkeit, über einen langen Zeitraum auf verschiedenen Oberflächen zu überleben, Antibiotika-Resistenzen auszubilden und genetisches Material von nicht verwandten Gattungen aufzunehmen, machen *A. baumannii*-Stämme zu schwer kontrollierbaren und bekämpfbaren nosokomialen Erregern [Wisplinghoff *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2012].

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein obligat aerobes, gramnegatives, nicht fermentierendes Stäbchenbakterium, das von oberflächlichen Hautinfektionen bis zur schweren Sepsis unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen kann [Neumeister *et al.*, 2009]. Es ist einer der häufigsten Verursacher nosokomialer Infektionen, vor allem von Pneumonien bei künstlich beatmeten Patienten auf Intensivstationen [Quinn, 1998; Breier *et al.*, 2009].

Durch die natürliche Resistenz gegenüber zahlreichen Antibiotika, wie Ampicillin, Amoxicillin, Cephalosporine der ersten und zweiten Generation, Cefotaxim, Ceftriaxon, Cefoxitin, Ertapenem, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Tigecyclin, sind die Behandlungsansätze bei einer *P. aeruginosa*-Infektion auf wenige Antibiotika (beispielsweise Cefepim, Ciprofloxacin und Carbapeneme) beschränkt [Wichelhaus, 2004/2005; Neumeister *et al.*, 2009; Leclercq *et al.*, 2011]. Die hohe intrinsische Resistenz wird durch unterschiedliche Resistenzmechanismen vermittelt. Dazu gehören energie-abhängige Efflux-Pumpen (z. B. MexAB-OprM und MexXY-OprM), chromosomal kodierte β -Lactamasen (z. B. induzierbare AmpC- β -Lactamase) und eine äußere Membran mit geringer Permeabilität. Die Resistenz kann durch verschiedene Mutationen noch weiter erhöht werden. [Livermore, 2002; Reinhardt *et al.*, 2007].

1.3 β -Lactamasen und ihr Wirkungsspektrum

Zur Behandlung bakterieller Infektionen kommen häufig β -Lactam-Antibiotika zum Einsatz. Diese besitzen einen β -Lactam-Ring und hemmen die Peptidoglykansynthese in der Bakterienzellwand. Die β -Lactam-Antibiotika werden in Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame unterteilt (Tabelle 1.1) [Stille *et al.*, 2005].

Tabelle 1.1: Einteilung der β -Lactam-Antibiotika [Stille *et al.*, 2005]

Gruppe	ausgewählte Vertreter
Penicilline	Ampicillin, Piperacillin, Ticarcillin
Cephalosporine	Cefazolin, Cefuroxim, Cefotaxim, Ceftazidim, Cefpodoxim, Cefoxitin
Carbapeneme	Imipenem, Meropene, Ertapenem
Monobactame	Aztreonam

Der häufigste Resistenzmechanismus humanpathogener Bakterien gegenüber den β -Lactam-Antibiotika ist, neben einer verminderten Permeabilität und veränderter Penicillin-Bindeproteine, die Bildung von β -Lactamasen [Stille *et al.*, 2005]. Diese Enzyme werden in den periplasmatischen Raum gramnegativer Bakterien abgegeben und hydrolysieren dort eindringende β -Lactam-Antibiotika [Theuretzbacher, 1998; Pfeifer, 2007]. Die β -Lactamase-Gene können sowohl chromosomal als auch plasmidkodiert vorliegen [Kanj & Kanafani, 2011].

Für die Einteilung der β -Lactamasen wurden mehrere Klassifizierungssysteme vorgeschlagen, denen verschiedene Eigenschaften, wie beispielsweise das Substratprofil oder die Lokalisation der Gene, als Unterscheidungsmerkmal zugrunde liegen [Wiegand, 2003]. Derzeit werden in der Literatur zwei Klassifizierungssysteme verwendet, die auf der Funktion [Bush *et al.*, 1995; Bush & Jacoby, 2010] und auf der Primärstruktur [Ambler, 1980] der β -Lactamasen basieren.

In dieser Arbeit wird die molekulare Klassifizierung der β -Lactamasen nach Ambler verwendet, die auf konservierten und charakteristischen Aminosäuresequenz-Motiven beruht (Tabelle 1.2). Es werden vier Klassen (A, B, C und D) unterschieden. Enzyme der Ambler-Klassen A, C und D hydrolysieren die β -Lactam-Antibiotika durch einen katalytischen Serinrest im aktiven Zentrum. Sie werden auch als Serin-Enzyme bezeichnet. Enzyme der Ambler-Klasse A hydrolysieren vorwiegend Penicilline und sind hauptsächlich auf Plasmiden kodiert. Der Ambler-Klasse D werden die Oxacillin-hydrolysierenden β -Lactamasen zugeordnet [Theuretzbacher, 1998]. Bei β -Lactamasen der Ambler-Klasse B wird die Hydrolyse der β -Lactam-Antibiotika durch Zink-Atome katalysiert. Sie werden deshalb auch Metallo- β -Lactamasen (MBL) genannt [Theuretzbacher, 1998; Wiegand, 2003].

Tabelle 1.2: Molekulare Klassifizierung der β -Lactamasen nach Ambler

[Theuretzbacher, 1998; Wiegand, 2003]

Ambler-Klasse	β -Lactamase	Substratspektrum
A	TEM-1, SHV-1	Penicilline, Cephalosporine der ersten Generation
A	ESBLs vom Typ TEM, SHV und CTX-M	Penicilline, Cephalosporine der ersten, zweiten und dritten Generation
A	KPC-1	Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme
B	IMP, VIM	alle β -Lactame, außer Monobactame
C	AmpC	alle β -Lactame, außer Carbapeneme
D	OXA-1	Oxacillin

1.3.1 ESBL

Der durch einen breiten Einsatz von β -Lactam-Antibiotika entstandene Selektionsdruck bewirkte Punktmutationen in verschiedenen ursprünglichen β -Lactamase-Genen (z.B. TEM-1, SHV-1), die zu Aminosäureaustauschen führten. Im Vergleich zu den ursprünglichen β -Lactamasen besitzen diese sogenannten ESBLs eine auf weitere β -Lactam-Antibiotika erweiterte Aktivität. Sie sind in der Lage, zusätzliche β -Lactam-Antibiotika, vor allem auch die Cephalosporine der dritten Generation, zu hydrolysieren (Tabelle 1.2) [Theuretzbacher, 1998; Geiss *et al.*, 2003; Pfeifer, 2007; Kanj & Kanafani, 2011].

Je nach Ursprung unterscheidet man verschiedene ESBL-Typen. ESBLs vom Typ TEM, SHV und CTX-M werden vorwiegend in *Enterobacteriaceae* exprimiert, während OXA- und PER-ESBLs meist nur bei *P. aeruginosa* detektiert werden. Zu den seltener vorkommenden ESBL-Typen zählen PER-1, VEB-1 und BES-1 [Geiss *et al.*, 2003; Kanj & Kanafani, 2011]. ESBLs vom Typ CTX-M, vor allem CTX-M-15, kommen weltweit am häufigsten vor [Kanj & Kanafani, 2011]. Auch in Deutschland ist CTX-M-15 zurzeit die am weitesten verbreitete ESBL bei *E. coli* [Kresken *et al.*, 2010].

Die verschiedenen ESBL-Typen besitzen jeweils ein charakteristisches Resistenzspektrum, das aus der unterschiedlichen Affinität der Enzym-Varianten zu den β -Lactam-Antibiotika resultiert. Praktisch alle ESBL-Bildner sind Cefpodoxim-resistent. TEM-ESBL- und SHV-ESBL-Bildner sind Ceftazidim-resistent und CTX-M-ESBL-Bildner Cefotaxim-resistent. Die Resistenz gegenüber den anderen Cephalosporinen ist variabel [SMS-Sachsen, 2012].

Die ESBL-Gene sind auf Plasmiden lokalisiert und können konjugativ auch über Artgrenzen hinweg auf andere Bakterien übertragen werden. Dies fördert eine rasche horizontale Ausbreitung dieses Resistenztyps [Geiss *et al.*, 2003; Pfeifer, 2007]. Um die Verbreitung der ESBL-Gene zu verhindern, ist die schnelle Diagnostik einer ESBL-

Bildung von großer Bedeutung. So ist beispielsweise in der CLSI-Norm und dem Konsensuspapier von Geiss *et al.*, 2003 ein phänotypischer ESBL-Bestätigungstest für *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* und *P. mirabilis* beschrieben, der auf der Hemmbarkeit der ESBLs durch den β -Lactamase-Inhibitor Clavulansäure basiert [Pfeifer, 2007; CLSI, 2012].

1.3.2 AmpC

AmpC-Enzyme sind klassische Vertreter der β -Lactamasen der Ambler-Klasse C (Tabelle 1.2). Sie besitzen eine große genetische Diversität. Jedem AmpC-Cluster liegt ein chromosomal kodiertes AmpC-Enzym zugrunde, von dem sich die plasmid-kodierten AmpC- β -Lactamasen ableiten [Pfeifer, 2007].

Die meisten *Enterobacteriaceae* und *P. aeruginosa* besitzen chromosomal kodierte *ampC*-Gene, deren Expression durch β -Lactam-Antibiotika induziert wird. Bei manchen Spezies (z.B. *E. coli*) werden die *ampC*-Gene konstitutiv in geringen Mengen exprimiert und sind nicht induzierbar [Wiegand, 2003; Kanj & Kanafani, 2011]. Auch *A. baumannii* besitzt eine chromosomal kodierte, aber nicht induzierbare AmpC- β -Lactamase, die auch als ADC (*Acinetobacter*-derived Cephalosporinase) bezeichnet wird [Howard *et al.*, 2012]. Bakterien der Spezies *Klebsiella* besitzen keine chromosomal kodierten *ampC*-Gene. Sie können jedoch, wie auch *E. coli*, plasmid-kodierte AmpC- β -Lactamasen erwerben [Wiegand, 2003; Kresken *et al.*, 2010; Kanj & Kanafani, 2011].

AmpC- β -Lactamasen vermitteln, in ausreichend produzierter Menge, Resistenz gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika, außer den Carbapenemen und den Cephalosporinen Cefepim und Cefpirom. Die Resistenz gegenüber den Cephalosporinen der dritten Generation kann nicht, bzw. nur in einem geringen Maße, durch den Einsatz von β -Lactamase-Inhibitoren gehemmt werden [Wiegand, 2003; Pfeifer, 2007; Kresken *et al.*, 2010]. Die Cefoxitin-Resistenz, auch als „AmpC-Indikatorresistenz“ bezeichnet, wird für die phänotypische Identifikation von AmpC- β -Lactamasen genutzt [Pfeifer, 2007].

Durch Mutation kann es zu einer konstitutiven Überproduktion (Derepression) der induzierbaren *ampC*-Gene kommen [Kresken *et al.*, 2010]. Wenn beispielsweise Patienten mit einer durch *E. cloacae* verursachten Infektion mit Cephalosporinen der dritten Generation behandelt werden, liegt die Wahrscheinlichkeit, dereprimierte Mutanten zu selektieren, bei etwa 50 % [Wiegand, 2003].

1.3.3 Carbapenemasen

Carbapenemasen sind die β -Lactamasen mit dem breitesten Wirkungsspektrum. Sie hydrolysieren Carbapeneme und die meisten anderen β -Lactam-Antibiotika [Kanj & Kanafani, 2011]. Zu den Carbapenemasen zählen die MBLs der Ambler-Klasse B und einige β -Lactamasen der Ambler-Klassen A und D (Tabelle 1.2) [Kresken *et al.*, 2010].

MBLs sind die klinisch bedeutsamsten Carbapenemasen. Sie hydrolysieren nahezu alle β -Lactam-Antibiotika, außer dem Monobactam Aztreonam [Nordmann & Poirel, 2002]. Ihre Aktivität wird durch Metallionen-Chelatoren wie EDTA, nicht aber durch die β -Lactamase-Inhibitoren Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam gehemmt [Wiegand, 2003]. Ursprünglich sind MBLs chromosomal kodierte Enzyme in gram-positiven und vereinzelt auch gramnegativen (z.B. L-1 in *S. maltophilia*) Bakterien. Von besonderer klinischer und epidemiologischer Bedeutung sind die auf Plasmiden und auf Integrone kodierten MBLs vom Typ IMP und VIM [Witte & Mielke, 2003]. Diese finden sich hauptsächlich bei *P. aeruginosa*. Sie können aber auch bei *Enterobacteriaceae* und *Acinetobacter* spp. detektiert werden [Wiegand, 2003; Bush & Jacoby, 2010]. Eine weitere MBL, die New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM), wurde zuerst im Jahr 2008 in einem *K. pneumoniae*-Isolat aus Indien nachgewiesen [Yong *et al.*, 2009]. NDM-Bildner sind resistent gegenüber allen Antibiotika, außer Tigecyclin und Colistin [Kabj & Kanafani, 2011]. Das *ndm*-Gen zeigt im Vergleich zu anderen Carbapenemase-Genen die schnellste geographische Verbreitung und besitzt eine hohe genetische Mobilität. So wurden im Jahr 2010 in Deutschland bereits zwei *E. coli*- und zwei *K. pneumoniae*-Stämme, sowie ein *A. baumannii*- und ein *A. junii*-Stamm mit NDM-Bildung isoliert [Gatermann & Kaase, 2011].

Carbapenemasen der Ambler-Klasse A werden im Gegensatz zu den MBLs durch Clavulansäure inhibiert und hydrolysieren Aztreonam [Kresken *et al.*, 2010]. Sie können plasmid-kodiert (z.B. KPC-1 in *K. pneumoniae*, GES-2 in *P. aeruginosa*) oder chromosomal kodiert (z.B. NMC-A in *E. cloacae*, SME in *S. marcescens*) vorliegen [Nordmann & Poirel, 2002]. KPC wurde zum ersten Mal in einem *K. pneumoniae*-Isolat aus einem Krankenhaus in North Carolina nachgewiesen [Yigit *et al.*, 2001]. Inzwischen verbreiten sich die plasmid-kodierten *kpc*-Gene weltweit auch auf andere Bakterienspezies [Richter *et al.*, 2011]. Auch in Deutschland werden vermehrt KPC-bildende *K. pneumoniae* isoliert [Gatermann & Kaase, 2011].

Die Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen der Ambler-Klasse D OXA-23, OXA-24 und OXA-58 finden sich hauptsächlich bei *A. baumannii*. Sie besitzen eine geringere Carbapenemase-Aktivität als MBLs und werden nicht durch Clavulansäure und Tazobactam, aber teilweise durch NaCl inhibiert. Die Gene der Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen können sowohl auf dem Chromosom (z.B. OXA-24) als auch auf Plasmiden (z.B. OXA-23) kodiert sein [Nordmann & Poirel, 2002; Wiegand, 2003; Poirel & Nordmann, 2006; Kresken *et al.*, 2010]. OXA-48 wurde erstmals im Jahr 2001 in einem *K. pneumoniae*-Isolat in einem türkischen Krankenhaus identifiziert. Derzeit ist sie in Deutschland die bei *Enterobacteriaceae* am häufigsten nachgewiesene Carbapenemase [Pfeifer, 2011].

1.4 Die Normensysteme von CLSI und EUCAST

Um im mikrobiologischen Diagnostiklabor unterschiedliche Resistenzmechanismen, inklusive der genannten β -Lactamasen, detektieren zu können, haben verschiedene Gesellschaften Normensysteme erstellt. In dieser Arbeit werden die Normensysteme der amerikanischen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) und der europäischen EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vorgestellt und verglichen.

Beide Normensysteme enthalten Standards für die Durchführung von Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmungen bei unterschiedlichen Bakterienspezies. Es sind sogenannte Breakpoints festgelegt, die angeben, bei welcher minimalen Hemmkonzentration (MHK), bzw. bei welchem Hemmhofdurchmesser, der untersuchte Bakterienstamm für das entsprechende Antibiotikum als sensibel, intermediär oder resistent einzustufen ist. Desweiteren enthalten die Normensysteme standardisierte Angaben über die Durchführung verschiedener Bestätigungstests, beispielsweise für ESBL-Bildung, und speziesabhängige Expertenregeln, mit denen Ableitungsregeln und natürliche Resistenzen definiert werden.

Im Unterschied zur amerikanischen CLSI-Norm werden im europäischen Normensystem der EUCAST klinische und pharmakologische Aspekte der antimikrobiellen Therapie stärker berücksichtigt. Desweiteren ermöglicht die Verwendung der EUCAST-Norm eine bessere Vergleichbarkeit von europäischen Resistenzstatistiken und von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien. Das ist eine wesentliche Voraussetzung zur Bekämpfung multiresistenter Bakterien [Bandt & Schwede, 2012].

Die EUCAST-Datenbank befindet sich derzeit noch im Aufbau und wird online kontinuierlich aktualisiert. Sie ist frei zugänglich. Das Normensystem der CLSI wird einmal jährlich aktualisiert.

1.5 Klassifizierung gramnegativer Bakterien

Zur Verhinderung bzw. Eindämmung einer weiteren Ausbreitung multiresistenter Bakterien, ist es notwendig, den zugrundeliegenden Resistenzmechanismus in Abhängigkeit vom verwendeten Normensystem zu bestimmen. Im mikrobiologischen Diagnostiklabor erfolgt die Bestimmung der Resistenzmechanismen in der Regel phänotypisch auf Grundlage des Wachstumsverhaltens der Bakterienstämme in Gegenwart verschiedener Antibiotika.

Dazu können für die Bakterienstämme Antibiotogramme mit Hilfe verschiedener Automatenysteme erstellt oder Agardiffusionstests durchgeführt werden. Das Verfahren der automatisierten Antibiotogramme basiert meist auf dem MHK-Wert. Dieser bezeichnet die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums oder einer anderen Substanz, bei der das Wachstum des Bakterienstammes gerade noch gehemmt wird [Neumeister *et al.*, 2009]. Anhand der gemessenen MHK-Werte bzw. Hemmhofdurchmesser und der in der verwendeten Norm (z.B. CLSI oder EUCAST) festgelegten Breakpoints werden die zu untersuchenden Bakterienstämme für die entsprechenden Antibiotika als resistent, sensibel oder intermediär eingestuft. Auf der Grundlage des Resistenzmusters können verschiedene Resistenzmechanismen zugeordnet bzw. abgeleitet werden. Dies ist jedoch meist nur eingeschränkt möglich, da sich verschiedene Resistenzmechanismen in einem Bakterienstamm überlagern können und so phänotypisch nicht zu detektieren bzw. klar voneinander abzugrenzen sind.

Bei der Erstellung automatisierter Antibiotogramme, beispielsweise über das VITEK 2- oder WalkAway-System, sind zusätzliche ESBL-Bestätigungstests integriert, welche auf der CLSI-Norm basieren. Grundlage dieser Bestätigungstests sind die MHK-Werte verschiedener Cephalosporine der dritten Generation mit und ohne Clavulansäure. Diese automatisierten ESBL-Bestätigungstests sind für *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *P. mirabilis* angegeben. Für andere *Enterobacteriaceae* und nicht-*Enterobacteriaceae* ist dieser Bestätigungstest nicht automatisiert. Für die gibt es bisher zur Bestimmung der Resistenzmechanismen nur Empfehlungen, die von verschiedenen Autoren vorgeschlagen und zur Diskussion gestellt werden.

Nach dem Konsensuspapier von Geiss *et al.*, 2003 erfolgt bei *Enterobacter* spp. ein Doppeldisk (DD)-Synergietest zum Nachweis einer ESBL, wenn für Cefpodoxim ein MHK-Wert $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ gemessen wurde. *Enterobacter* spp. besitzt jedoch eine chromosomal kodierte, induzierbare AmpC- β -Lactamase, die bei Überexpression das Ergebnis des DD-Synergietests beeinflussen kann [Geiss *et al.*, 2003].

Nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 werden *Acinetobacter* spp. und *P. aeruginosa* als multiresistent eingestuft, wenn die Carbapeneme Imipenem und/oder Meropenem intermediär oder resistent getestet werden.

Eine neue Möglichkeit zur Klassifizierung gramnegativer Bakterien wurde von Mattner *et al.*, 2012 vorgeschlagen, wonach die Einteilung in multiresistente und nicht multiresistente Bakterien auf der Grundlage der Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotikagruppen vorgenommen wird. Die Empfehlung berücksichtigt auch die Definition multiresistenter, gramnegativer Erreger der Kommission für Krankenhaus-hygiene und Infektionsprävention (KRINKO) und die Konsensusempfehlung für Baden-Württemberg [von Baum *et al.*, 2010; von Baum *et al.*, 2011]. Die Definition der Multiresistenz nach Mattner *et al.*, 2012 basiert auf der Bewertung der vier Antibiotikagruppen Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Fluorchinolone anhand von gruppenspezifischen Leitsubstanzen. Diese Antibiotikagruppen wurden gewählt, da sie als primäre Therapeutika bei schweren Infektionen eingesetzt werden. Andere Antibiotika mit geringer klinischer Relevanz (z.B. Aminoglycoside) werden hingegen bei der Definition nicht berücksichtigt [von Baum *et al.*, 2011]. Eine Multiresistenz liegt dann vor, wenn die Leitsubstanzen aus maximal einer der vier oben genannten Antibiotikagruppen sensibel getestet werden. Der entsprechende Stamm wird dann als MRGNE (multiresistenter gramnegativer Erreger) bezeichnet. Zusätzlich wird die Anzahl der resistenten Antibiotikagruppen angegeben (3 MRGNE, wenn Resistenz gegen drei der vier Antibiotikagruppen und 4 MRGNE, wenn Resistenz gegen alle vier Antibiotikagruppen) [Mattner *et al.*, 2012].

Für die Bewertung der Multiresistenz dienen bei *Enterobacteriaceae* die Leitsubstanzen Piperacillin/Tazobactam (Penicilline), Cefotaxim (Cephalosporine), Imipenem, Meropenem oder Ertapenem (Carbapeneme) und Ciprofloxacin (Fluorchinolone). *P. aeruginosa*-Stämme werden nach den Empfindlichkeiten der Leitsubstanzen Piperacillin oder Piperacillin/Tazobactam (Penicilline), Ceftazidim (Cephalosporine), Meropenem (Carbapeneme) und Ciprofloxacin (Fluorchinolone) eingeteilt. Die Klassifizierung der *A. baumannii*-Stämme erfolgt durch die Empfindlichkeitsbestimmung von Imipenem (Carbapeneme) und Ciprofloxacin (Fluorchinolone). Penicilline und Cephalosporine werden bei *A. baumannii* nicht mit berücksichtigt, da Bakterien der Gattung *Acinetobacter* eine Resistenz gegenüber Penicillinen aufweisen und Cephalosporine der dritten Generation klinisch meist nicht wirksam sind. Im Gegensatz zur CLSI werden von der EUCAST für diese beiden Antibiotikagruppen keine Breakpoints zur Empfindlichkeitsbestimmung angegeben [Neumeister *et al.*, 2009; EUCAST, 2012; Mattner *et al.*, 2012].

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 2.1: Geräte und Zubehör

Geräte/Zubehör	Hersteller
Abstrichtupfer (Transwab)	nerbe plus GmbH
Applikator (steril)	Böttger oHG
DensiCHECK	bioMérieux Deutschland
Holzstäbchen (steril)	Diagonal
Impföse (10 µl, steril)	nerbe plus GmbH
Impfwanne	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
MALDI Biotyper-Microflex LT 60	Bruker Daltonik GmbH
Pinzette (Einweg-Pinzette, steril)	Servoprax GmbH
Pipette (0,5 µl - 10 µl)	Eppendorf AG
Prompt Inokulationssystem-D	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
Reagenzröhrchen (5 ml)	SARSTEDT AG & Co.
RENOK-Inokulator	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
Rührspatel	Diagonal GmbH & Co. KG
Target (MSP 96 Target polished steel)	Bruker Daltonik GmbH
VITEK 2	bioMérieux Deutschland
VITEK 2-Resistenzkarten (AST-N110, AST-N118, AST-N223, AST-N248)	bioMérieux Deutschland
Vortexer	Heidolph
WalkAway - 96 <i>plus</i>	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
WalkAway Panels (nm37, nbc42)	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH

2.2 Antibiotika-Testblättchen und -Teststreifen

Tabelle 2.2: Antibiotika-Testblättchen und -Teststreifen

Testblättchen/Teststreifen	Hersteller
Cefotaxim (30 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Cefotaxim (30 µg) + Clavulansäure (10 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Cefoxitin (30 µg)	Oxoid Deutschland GmbH
Cefpodoxim (10 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Cefpodoxim (10 µg) + Clavulansäure (1 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Ceftazidim (30 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Ceftazidim (30 µg) + Clavulansäure (10 µg)	MAST Diagnostica GmbH
Ertapenem (10 µg)	Oxoid Deutschland GmbH
Imipenem (10 µg)	Oxoid Deutschland GmbH
KPC/MBL Identifikations-Kit	Rosco Diagnostica
MBL-Etest (Imipenem)	bioMérieux Deutschland
MBL-Etest (Meropenem)	bioMérieux Deutschland
Meropenem (10 µg)	Oxoid Deutschland GmbH

2.3 Nährmedien

Tabelle 2.3: Nährmedien

Nährmedium	Hersteller
MH2-Agar	bioMérieux Deutschland
COS-Agar (Columbia Agar + 5% Schafblut)	bioMérieux Deutschland
MCK-Agar	bioMérieux Deutschland

2.4 Chemikalien

Tabelle 2.4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Matrix (α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)	Bruker Daltonik GmbH
0,45% sterile NaCl-Lösung (pH 5,0)	bioMérieux Deutschland
0,85% sterile NaCl-Lösung	bioMérieux Deutschland

2.5 Bakterienstämme

Tabelle 2.5: ATCC-Referenzstämme

Referenzstamm	Lieferant
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Doenitz ProLab
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Doenitz ProLab
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Doenitz ProLab
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13636 (DSM-24970)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Tabelle 2.6: Stämme mit molekularbiologisch bestätigtem Resistenzmechanismus

Die Resistenzmechanismen der Bakterienstämme wurden am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhausreger der Ruhr-Universität Bochum über molekularbiologische Methoden detektiert.

Stamm-ID und Stamm-Nummer	Resistenzmechanismus	NRZ-Nummer
<i>Escherichia coli</i>	AmpC-Überproduktion und Porinverlust	NRZ-03991
<i>Klebsiella pneumoniae</i> -1	KPC-2	NRZ-03237
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -1	ESBL vom Typ PER-1	NRZ-02282
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -5	ESBL vom Typ PER-1	NRZ-04715
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -6	MBL vom Typ IMP-7	NRZ-00834

2.6 Software

Tabelle 2.7: Software

Software	Hersteller
Advanced Expert System	bioMérieux Deutschland
Compass 1.2 SR1	Bruker Daltonik GmbH
HighflexX	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
LabPro V3.0 MultiRegional	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
MALDI Biotyper 2.0	Bruker Daltonik GmbH
Medizinisches Informationssystem	CSMed GmbH
PROMED-open	MCS Modulare Computer und Software Systeme AG
ValiScanTM Expert-System	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH
VITEK 2-Systems Software	bioMérieux Deutschland

3 Methode

Alle praktisch durchgeführten Arbeiten wurden nach den Qualitätskriterien der nach DIN EN ISO 15189:2007 akkreditierten Mikrobiologie-Abteilung der Labormedizinischen Partnerschaft durchgeführt. Die nachfolgend benannten Methoden zur Erregeridentifizierung und Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit bereits Bestandteil der mikrobiologischen Diagnostik. Sie wurden entsprechend der Qualitätskriterien validiert und werden kontinuierlich durch interne und externe Qualitätskontrollen überprüft:

- Keimidentifizierung über MALDI-TOF MS
(Bruker Daltonik GmbH)
- Erstellung automatisierter Antibiotigramme mit dem VITEK 2-System
(bioMérieux Deutschland)
- Erstellung automatisierter Antibiotigramme mit dem WalkAway-System
(Siemens Healthcare Diagnostics GmbH)
- Doppeldisk (DD)-Synergietest zum ESBL-Nachweis
(MAST Diagnostica GmbH)
- MBL-Etest (Imipenem) zum MBL-Nachweis
(bioMérieux Deutschland)

In der Labormedizinischen Partnerschaft wird derzeit nach der aktuellen CLSI-Norm gearbeitet [CLSI, 2012]. Eine Umstellung auf das europäische Normensystem der EUCAST soll erfolgen [EUCAST, 2012].

Zur externen Qualitätskontrolle der Ergebnisse dieser Arbeit fanden auch Ergebnisse des nationalen Referenzzentrums (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger an der Ruhr-Universität Bochum Verwendung.

3.1 Stammsammlung und Stammpflege

Die zur detaillierten Analyse ausgewählten Bakterienstämme wurden bis zur Durchführung der verschiedenen Bestätigungstests mit Abstrichtupfern (Transwabs) konserviert. Dafür werden einige Kolonien des entsprechenden Bakterienstammes mit dem Abstrichtupfer aufgenommen und in das Transportröhrchen mit dem Transportmedium überführt. Nach einer Übernacht-Bebrütung bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ können die Transwabs bei Raumtemperatur für mehrere Monate stabil gelagert werden.

Vor Durchführung der verschiedenen Bestätigungstests, werden die Abstrichtupfer zunächst auf COS-Agar ausgestrichen und über Nacht bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet.

3.2 Keimidentifizierung über MALDI-TOF MS

Eine Einzelkolonie einer Übernachtskultur (18 - 24 h) wird von einem konventionellen Nährmedium (z.B. COS- oder MCK-Agar) mit einem sterilen Holzstäbchen auf ein Target aufgetragen, bei Raumtemperatur kurz angetrocknet, mit 1 μl Matrix überschichtet und erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Das Target mit der Probe wird dann zur Analyse in den MALDI-Biotyper eingelegt.

Die Identifikation der Keime im MALDI-Biotyper erfolgt massenspektrometrisch über MALDI-TOF MS. Durch Laserbeschuss werden Protonen von den Matrixmolekülen auf die Proteine der Probe übertragen. Es entstehen Proteinionen, die in einem elektrischen Feld (20 kV) beschleunigt werden. In Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht benötigen sie unterschiedliche Flugzeiten bis zum Detektor. Diese Flugzeiten werden gemessen und das entsprechende Molekulargewicht der Proteine abgeleitet. Der zu berücksichtigende Massenbereich liegt dabei zwischen 2000 und 20000 Da [Tonolla *et al.*, 2011]. Es entsteht ein Massenspektrum, welches mit den in der Bruker-Keimdatenbank hinterlegten Massenspektren verglichen wird. Die zehn besten Übereinstimmungen werden ermittelt und deren Score bestimmt. Alle Ergebnisse müssen auf Plausibilität geprüft und gegebenenfalls wiederholt bzw. alternativ getestet werden.

3.3 Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung

3.3.1 Erstellung von Antibiogrammen mit dem VITEK 2-System

Aus einer Übernachtskultur (18 - 24 h, auf COS- oder MCK-Agar) wird in 2,5 ml 0,45% steriler NaCl-Lösung eine Keimsuspension mit einem McFarland von 0,5 - 0,625 hergestellt. Diese standardisierte Keimsuspension wird auf einem Carrier zusammen mit der entsprechenden VITEK 2-Resistenzkarte (für gramnegative Erreger die Karten AST-N110, AST-N118, AST-N223 oder AST-N248) zur Analyse in den VITEK 2 gestellt.

Für die Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung verwendet das VITEK 2-System das Mikrodilutionsverfahren, wobei es sich um eine miniaturisierte Version der geometrischen Reihe zur MHK-Bestimmung handelt. Während einer Inkubationszeit von bis zu 18 h wird das Wachstum in den einzelnen Kammern der VITEK 2-Resistenzkarte, die mit jeweils verschiedenen konzentrierten Antibiotika bestückt sind, gemessen. Aus den für die Antibiotika ermittelten MHK-Werten legt das VITEK 2-System auf der Grundlage der aktuellen CLSI-Norm die entsprechenden Interpretationen (sensible, intermediär oder resistent) fest. Das Advanced Expert System des VITEK 2-Systems überprüft die Ergebnisse auf Plausibilität und ermittelt den wahrscheinlichsten Phänotyp des untersuchten Bakterienstammes, wobei wiederum die CLSI-Norm als Referenz dient und die MHK-Verteilung des Wildtyp-Stammes einbezogen wird [bioMérieux, 2012].

Die Qualitätskontrollen der Resistenzkarten AST-N118, AST-N190 und AST-N223 erfolgen mit den Referenzstämmen *E. coli* ATCC 25922 und *K. pneumoniae* ATCC 700603. Die Qualität der Resistenzkarten AST-N248 und AST-N110 wird mit dem Referenzstamm *P. aeruginosa* ATCC 27853 kontrolliert.

3.3.2 Erstellung von Antibiogrammen mit dem WalkAway-System

Zur Herstellung der Bakteriensuspension werden drei Einzelkolonien einer Übernachtskultur (18 - 24 h, auf COS- oder MCK-Agar) mit einem Beimpungsstäbchen aufgenommen und in eine Inokulationsflasche überführt. Durch kräftiges Schütteln der Flasche wird eine Bakteriensuspension hergestellt, die in die Impfwanne gegeben wird. Mit Hilfe des RENOK-Inokulators erfolgt dann die Beimpung des entsprechenden Panels (bei gramnegativen Erregern das Panel nm37 oder nbc42), das dann zur Analyse in den WalkAway - 96 *plus* gestellt wird.

Die Kammern des Panels enthalten verschieden konzentrierte Antibiotika. Nach 16- bis 20-stündiger Inkubation bei 35°C wird der MHK-Wert für den getesteten Bakterien-

stamm bestimmt, indem die geringste Antibiotika-Konzentration abgelesen wird, bei der eine Wachstumshemmung auftritt. Die ermittelten MHK-Werte werden durch die LabPro-Software und das ValiScan-Expertensystem auf Grundlage der von der CLSI aktuell festgelegten Breakpoints ausgewertet und interpretiert. Genauere Informationen über den Ablauf der Antibiogrammerstellung über das WalkAway-System sind den Angaben des Herstellers (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH) zu entnehmen.

Die Qualitätskontrolle des Panels nm37 erfolgt mit den Referenzstämmen *E. coli* ATCC 25922 und *K. pneumoniae* ATCC 700603 und die des Panels nbc42 mit dem Referenzstamm *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.4 Nachweis von β -Lactamasen

Der Nachweis von ESBL- und Carbapenemase-Bildung kann durch verschiedene phänotypische Tests erfolgen.

3.4.1 ESBL-Bestätigungstests

Werden bei der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung über das WalkAway-System erhöhte MHK-Werte für Ceftazidim, Aztreonam, Cefotaxim, Ceftriaxon (jeweils ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) und Cefpodoxim (≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) gemessen, ist dies ein Hinweis für das Vorliegen einer ESBL. Es erfolgt dann ein automatisierter ESBL-Bestätigungstest, der für *Klebsiella* spp., *E. coli* und *P. mirabilis* validiert ist. Die ESBL-Bildung gilt als bestätigt, wenn der MHK-Wert von Cefotaxim und/oder Ceftazidim in Kombination mit Clavulansäure um mindestens drei Doppelverdünnungsstufen niedriger liegt als der MHK-Wert für das Antibiotikum ohne Inhibitor.

Beim VITEK 2-System wird für *Klebsiella* spp. und *E. coli* der automatisierte ESBL-Bestätigungstest, wenn für Cefpodoxim ein MHK-Wert ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt wurde. Er erfolgt über die MHK-Bestimmung von Cefepim, Cefotaxim und Ceftazidim jeweils mit und ohne Clavulansäure [bioMérieux, 2012].

Für andere *Enterobacteriaceae* wird nach dem Konsensuspapier von Geiss *et al.*, 2003 bei vorliegendem ESBL-Verdacht (MHK von Cefpodoxim ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$) ein DD-Synergietest zum Nachweis einer ESBL durchgeführt. Dazu wird mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm in 0,85% NaCl-Lösung ein Inokulum mit einem McFarland von 0,5 hergestellt und mit einem sterilen Applikator gleichmäßig auf zwei MH2-Agarplatten ausgestrichen. Auf die eine Agarplatte werden drei Antibiotika-Testblättchenpaare (Ceftazidim (30 μg) und Ceftazidim/Clavulansäure (30/10 μg), Cefotaxim (30 μg) und Cefotaxim/Clavulansäure (30/10 μg), Cefpodoxim (10 μg) und Cefpodoxim/Clavulansäure (10/1 μg)) und auf die zweite Agarplatte ein Cefoxitin-Testblättchen (30 μg) aufgelegt. Nach 18 - 24 stündiger Inkubation bei 35 - 37°C erfolgt die Auswertung. Der

Bakterienstamm ist als ESBL-positiv zu bewerten, wenn bei mindestens einem Testblättchenpaar der Hemmhofdurchmesser des Testblättchens mit Clavulansäure mindestens 5 mm größer ist als der Hemmhofdurchmesser des Testblättchens ohne Clavulansäure. Zusätzlich muss Cefoxitin sensibel sein, d. h. der Hemmhofdurchmesser muss mindestens 18 mm betragen. Sollte Cefoxitin resistent sein, könnte eine AmpC- β -Lactamase vorliegen und die Auswertung des ESBL-Bestätigungstest ist nur eingeschränkt möglich. Alle ESBL-positiv getesteten Stämme sollten als resistent gegenüber den Penicillinen und Cephalosporinen angegeben werden [Geiss *et al.*, 2003].

Als Positivkontrolle des DD-Synergietests wird *K. pneumoniae* ATCC 700603 und als Negativkontrolle *E. coli* ATCC 25922 verwendet [CLSI, 2012].

3.4.2 Modifizierter Hodge-Test

Der modifizierte Hodge-Test (MHT) ist eine Methode zum Nachweis bzw. Ausschluss einer Carbapenemase. Die Anwendbarkeit im mikrobiologischen Diagnostiklabor wurde in dieser Arbeit geprüft.

Mit einer *E. coli* ATCC 25922 -Übernachtskultur wird in 5 ml 0,85% NaCl-Lösung eine Keimsuspension (0,5 McFarland) hergestellt. Aus dieser Keimsuspension wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt, indem 0,5 ml der Keimsuspension in 4,5 ml 0,85% NaCl-Lösung gegeben werden. Mit einem sterilen Applikator wird die 1:10 Verdünnung auf einer MH2-Agarplatte ausgestrichen. Nach 3 - 5 Minuten Trocknungszeit wird in die Mitte der Agarplatte ein 10 μ g Meropenem-Testblättchen (oder 10 μ g Imipenem bzw. 10 μ g Ertapenem) gelegt und mit einer sterilen 10 μ l-Impföse 3 - 5 Kolonien des zu testenden Bakterienstammes mit einem geraden Strich vom Rand des Testblättchens bis zum Rand der Agarplatte aufgetragen [CLSI, 2012].

Nach einer Inkubationszeit von 16 - 20 h bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ erfolgt die Auswertung des Testergebnisses. Wächst der Indikatorstamm *E. coli* ATCC 25922 am Rand des Impfstriches in den Hemmhof des Testblättchens hinein, ist dieser Stamm MHT-positiv und kann als Carbapenemase-Bildner bewertet werden. Bei MHT-negativen Stämmen, die keine Carbapenemase bilden, erfolgt dieses Wachstum in den Hemmhof nicht (Abbildung 3.1) [CLSI, 2012].

Bei jeder Versuchsdurchführung werden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Da die von der CLSI angegebenen Kontrollstämme zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, wurde *P. aeruginosa* ATCC 27853 als Negativkontrolle verwendet. Für die Positivkontrolle konnte auf eine durch das NZR für gramnegative Krankenhauskeimer bestätigte KPC-2-bildenden *K. pneumoniae* zurückgegriffen werden (NRZ-03237) (Abbildung 3.1).

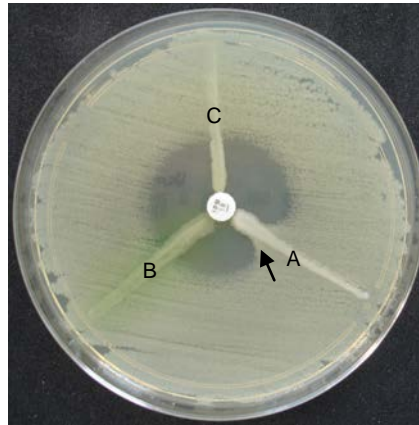


Abbildung 3.1: Auswertung des modifizierten Hodge-Test

Der MHT wird auf MH2-Agar mit *E. coli* ATCC 25922 als Indikatorstamm durchgeführt. In der Mitte ist ein Imipenem-Testblättchen (10 µg) aufgelegt.

A (Positivkontrolle): Der MHT ist als positiv zu bewerten, wenn der Indikatorstamm entlang des Probenimpfstriches (NRZ-03237) in den Imipenem-Hemmhof hinein wächst.

B (Negativkontrolle): Wächst der Indikatorstamm nicht entlang des Probenimpfstriches (*P. aeruginosa* ATCC 27853) in den Imipenem-Hemmhof hinein, ist der MHT als negativ zu bewerten.

C: Negatives MHT-Ergebnis einer Patientenprobe.

3.4.3 MBL-Etest

Zum Nachweis bzw. Ausschluss einer MBL-Bildung wird bei Stämmen mit vorliegender Carbapenem-Resistenz oder nachgewiesener Carbapenemase-Bildung ein MBL-Etest der Firma bioMérieux durchgeführt. Bei diesem wird das Verhältnis der MHK-Werte von Imipenem zu Imipenem/EDTA bzw. von Meropenem zu Meropenem/EDTA gemessen. Nach Herstellerangaben sind der MBL-Etest (Imipenem) für alle gram-negativen, aeroben Bakterien und der MBL-Etest (Meropenem) für *Enterobacteriaceae* geeignet. Auf den MBL-Etest-Streifen sind Konzentrationsgradienten von Imipenem (4 - 256 µg/ml) und Imipenem (1 - 64 µg/ml) plus gleichbleibende Menge an EDTA bzw. Meropenem (0,125 - 8 µg/ml) und Meropenem (0,032 - 2 µg/ml) plus gleichbleibende Menge an EDTA aufgebracht.

Der MBL-Etest (Imipenem) ist, im Gegensatz zum MBL-Etest (Meropenem), bereits für die Anwendung in der Labormedizinischen Partnerschaft etabliert. Der MBL-Etest (Meropenem) wurde in dieser Arbeit auf seine Anwendbarkeit im mikrobiologischen Diagnostiklabor getestet.

Im ersten Schritt wird aus der zu untersuchenden Übernachts-Agarkultur (18 - 24 h) und einer 0,85% NaCl-Lösung ein Inokulum mit einem McFarland von 0,5 hergestellt. Dieses wird mit einem sterilen Applikator gleichmäßig auf eine MH2-Agarplatte ausgestrichen. Zum Schluss wird ein MBL-Etest-Streifen (Imipenem) bzw. ein MBL-Etest-Streifen (Meropenem) auf die Agaroberfläche gelegt. Nach einer Inkubation von 16 - 18 h bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ erfolgt die Ablesung des Ergebnisses. Dazu werden die MHK-Werte an der Stelle abgelesen, an der der jeweilige Hemmhof den Teststreifen berührt.

Nach Angaben des Herstellers zeigt eine Absenkung des MHK-Wertes um mindestens drei Doppelverdünnungen in Anwesenheit von EDTA bzw. ein Quotient der MHK-Werte des Antibiotikums zu Antibiotikum plus EDTA von ≥ 8 die Anwesenheit einer MBL an. Auch eine Deformation der Ellipse oder das Auftreten einer Phantomzone deuten auf MBL-Bildung hin.

P. aeruginosa ATCC 27853 wird als Negativkontrolle und *S. maltophilia* ATCC 13636 aufgrund seiner intrinsischen MBL-Bildung als Positivkontrolle des MBL-Etests (Imipenem) verwendet [Kaleem *et al.*, 2012]. Für den MBL-Etest (Meropenem) stand zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit *K. pneumoniae* ATCC 700603 als Negativkontrolle zur Verfügung.

3.4.4 KPC/MBL-Bestätigungstest

Eine Resistenz bzw. verminderte Empfindlichkeit gegenüber den Carbapenemen kann durch verschiedene β -Lactamasen vermittelt werden. Das KPC/MBL Identifikations-Kit von Rosco Diagnostica ermöglicht die Unterscheidung von AmpC-Überproduktion, KPC und MBL. Für die Unterscheidung wird die Hemmbarkeit der β -Lactamasen durch verschiedene β -Lactamase-Inhibitoren (Borsäure, Cloxacillin und Dipicolinsäure) verwendet (Abbildung 3.2). Dieser Test ist eine weitere Möglichkeit zur Detektion von β -Lactamasen, der in dieser Arbeit auf seine Anwendbarkeit im mikrobiologischen Diagnostiklabor geprüft wurde.

Zunächst wird mit einer Übernacht-Agar-Kultur (18 - 24 h) des zu untersuchenden Stammes und einer 0,85% NaCl-Lösung eine Suspension (0,5 McFarland) hergestellt. Diese wird mit einem sterilen Applikator gleichmäßig auf einer MH2-Platte ausgestrichen. Nach einer kurzen Trockenzeit werden die vier Testblättchen (10 μ g Meropenem, 10 μ g Meropenem + Borsäure, 10 μ g Meropenem + Cloxacillin, 10 μ g Meropenem + Dipicolinsäure) aufgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 18 ± 2 h bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ kann das Ergebnis abgelesen werden, wobei die Hemmhofdurchmesser um die Testblättchen gemessen werden. Wächst der Keim vollständig an das Testblättchen heran, entspricht dies einen Hemmhofdurchmesser von 9 mm. Die Vergrößerungen der Hemmhofdurchmesser um die Testblättchen mit Inhibitor im Vergleich zu dem Testblättchen ohne Inhibitor werden, wie in Tabelle 3.1 nach Herstellerangaben angeführt, interpretiert. Liegen alle Hemmhofdurchmesser maximal 3 mm auseinander, liegt weder eine MBL, noch eine KPC oder eine AmpC- β -Lactamase vor.

Vom Hersteller sind keine Qualitätskontroll-Stämme angegeben. In dieser Arbeit wurde als Negativkontrolle *P. aeruginosa* ATCC 27853, und als Positivkontrollen die durch das NRZ für gramnegative Krankenhauserreger bestätigte KPC-2-bildende *K. pneumoniae* (NRZ-03237) und der AmpC-überproduzierende *E. coli* mit zusätzlichem Porinverlust (NRZ-03991) verwendet.

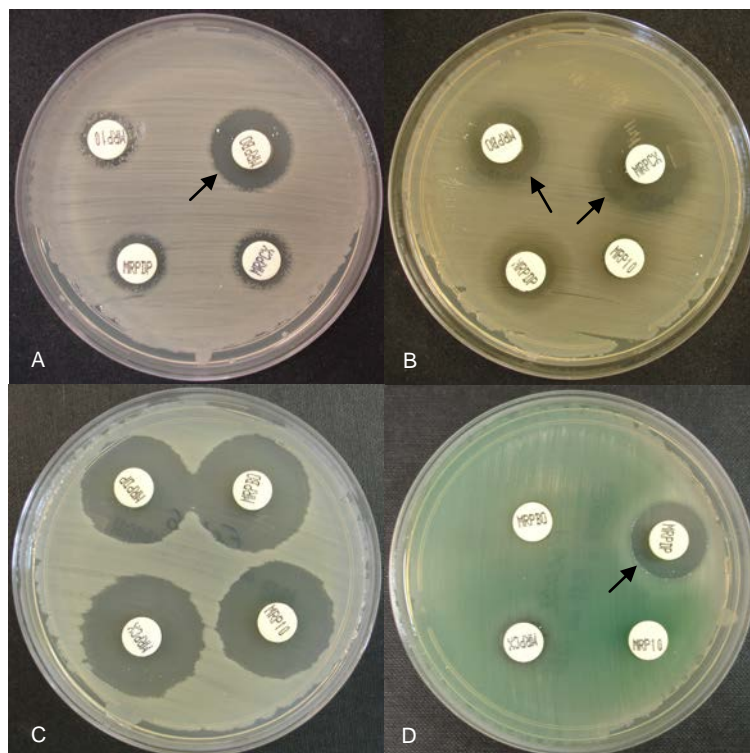


Abbildung 3.2: Auswertung des KPC/MBL-Bestätigungstests

Dargestellt ist der KPC/MBL-Bestätigungstest auf MH2-Agar mit den jeweiligen Hemmhofdurchmessern für Meropenem-Testplättchen (MRP10) und Meropenem-Testplättchen + Inhibitor.

A (Positivkontrolle: NRZ-03237): Eine Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers um das Testblättchen mit Meropenem + Borsäure (MRP BO) von ≥ 4 mm zeigt KPC-Bildung an.

B (Positivkontrolle: NRZ-03991): AmpC-Überproduktion mit zusätzlichem Porinverlust wird durch eine Vergrößerung des Hemmhofdurchmessers von ≥ 4 mm um das Testblättchen mit Meropenem + Borsäure und von ≥ 5 mm um das Testblättchen mit Meropenem + Cloxacillin (MRP CX) angezeigt.

C (Negativkontrolle: *P. aeruginosa* ATCC 27853): Liegen alle Hemmhofdurchmesser maximal 3 mm auseinander, liegt weder eine KPC, noch eine MBL oder eine AmpC-Überproduktion vor.

D: Bei diesem *P. aeruginosa*-Isolat einer Patientenprobe zeigt die Hemmhofvergrößerung um das Testblättchen mit Meropenem + Dicolinsäure (MRP DP) von ≥ 5 mm MBL-Bildung an.

Tabelle 3.1: Auswertung des KPC/MBL-Bestätigungstests

Zur Interpretation des KPC/MBL-Bestätigungstestes werden die Hemmhofdurchmesser um die Testblättchen gemessen und die Differenzen von Meropenem + Inhibitor zu Meropenem ermittelt. Je nach ermittelter Hemmhofvergrößerung kann zwischen MBL, KPC und AmpC-Überproduktion mit Porinverlust unterschieden werden. Sind alle Hemmhofdifferenzen ≤ 3 mm, liegt weder eine MBL, noch eine KPC oder eine AmpC- β -Lactamase mit Porinverlust vor.

Resistenzmechanismus	<u>Differenz zu Hemmhofdurchmesser des Meropenem-</u>		
	<u>Testblättchens</u>		
	Meropenem + Borsäure	Meropenem + Dicolinsäure	Meropenem + Cloxacillin
AmpC + Porinverlust	≥ 4 mm	< 5 mm	≥ 5 mm
KPC	≥ 4 mm	< 5 mm	< 5 mm
MBL	< 5 mm	≥ 5 mm	< 5 mm

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Normen von CLSI und EUCAST

4.1.1 Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung

Um die Antibiotika-Empfindlichkeit für den zu untersuchenden Bakterienstamm zu bestimmen, werden zunächst die MHK-Werte bestimmt und diese dann anhand der in der verwendeten Norm festgelegten Breakpoints interpretiert. In den Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 sind die Breakpoints der CLSI- und der EUCAST-Norm für *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. und *P. aeruginosa* gegenübergestellt. Es sind nur die Antibiotika dargestellt, die für den entsprechenden Keim bzw. für die entsprechende Keimgruppe als Leitsubstanz bei der Definition für MRGNE nach Mattner *et al.*, 2012 (Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidim, Cefotaxim, Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Ciprofloxacin); als ESBL-Marker (Cefoxitin, Cefpodoxim, Cefotaxim, Ceftazidim, Aztreonam); und als Carbapenemase-Marker (Imipenem, Meropenem, Ertapenem) dienen.

Tabelle 4.1: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für *Enterobacteriaceae*

Angegeben sind die von CLSI und EUCAST für das jeweilige Antibiotikum festgelegten Hemmhofdurchmesser und minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), bei denen der Bakterienstamm als sensibel (S), intermediär (I) bzw. resistent (R) zu bewerten ist [CLSI, 2012; EUCAST, 2012].

: Übereinstimmung zwischen beiden Normen

Antibiotikum	Norm	Testblättchen-Konzentration [µg]	Hemmhof-durchmesser [mm]			MHK [µg/ml]		
			S	I	R	S	I	R
Piperacillin/ Tazobactam	CLSI	100/10	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≤ 16/4	32/4-64/4	≥ 128/4
	EUCAST	30/6	≥ 20	17 - 19	< 17	≤ 8/4	16/4	> 16/4
Cefotaxim	CLSI	30	≥ 26	23 - 25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	5	≥ 20	17 - 19	< 17	≤ 1	2	> 2
Cefpodoxim	CLSI	10	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≤ 2	4	≥ 8
	EUCAST	10	≥ 21	-	< 21	≤ 1	-	> 1
Ceftazidim	CLSI	30	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
	EUCAST	10	≥ 22	19 - 21	< 19	≤ 1	2 - 4	> 4
Cefoxitin	CLSI	30	≥ 18	15 - 17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
	EUCAST	30	≥ 19	-	< 19	-	-	-
Imipenem	CLSI	10	≥ 23	20 - 22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	10	≥ 22	16 - 21	< 16	≤ 2	4 - 8	> 8
Meropenem	CLSI	10	≥ 23	20 - 22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	10	≥ 22	16 - 21	< 16	≤ 2	4 - 8	> 8
Ertapenem	CLSI	10	≥ 22	19 - 21	≤ 18	≤ 0,5	1	≥ 2
	EUCAST	10	≥ 25	22 - 24	< 22	≤ 0,5	1	> 1
Aztreonam	CLSI	30	≥ 21	18 - 20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
	EUCAST	30	≥ 27	24 - 26	< 24	≤ 1	2 - 4	> 4
Ciprofloxacin	CLSI	5	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	5	≥ 22	19 - 21	< 19	≤ 0,5	1	> 1

Tabelle 4.2: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für *Acinetobacter* spp.

Angegeben sind die von CLSI und EUCAST für das jeweilige Antibiotikum festgelegten Hemmhofdurchmesser und minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), bei denen der *Acinetobacter*-Stamm als sensibel (S), intermediär (I) bzw. resistent (R) zu bewerten ist [CLSI, 2012; EUCAST, 2012].

: Übereinstimmung zwischen beiden Normen

Antibiotikum	Norm	Testblättchen-Konzentration [µg]	Hemmhof-durchmesser [mm]			MHK [µg/ml]		
			S	I	R	S	I	R
Cefotaxim	CLSI	30	≥ 23	15 - 22	≤ 14	≤ 8	16 - 32	≥ 64
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Cefpodoxim	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidim	CLSI	30	≥ 18	15 - 17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Cefoxitin	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Imipenem	CLSI	10	≥ 16	14 - 15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16
	EUCAST	10	≥ 23	17 - 22	< 17	≤ 2	4 - 8	> 8
Meropenem	CLSI	10	≥ 16	14 - 15	≤ 13	≤ 4	8	≥ 16
	EUCAST	10	≥ 21	15 - 20	< 15	≤ 2	4 - 8	> 8
Ertapenem	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacin	CLSI	5	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	5	≥ 21	-	< 21	≤ 1	-	> 1

Tabelle 4.3: Breakpoints der CLSI und der EUCAST für *Pseudomonas aeruginosa*

Angegeben sind die von CLSI und EUCAST für das jeweilige Antibiotikum festgelegten Hemmhofdurchmesser und minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), bei denen der *P. aeruginosa*-Stamm als sensibel (S), intermediär (I) bzw. resistent (R) zu bewerten ist. Die Normen der CLSI gelten ausschließlich für *P. aeruginosa*, die der EUCAST auch für alle anderen *Pseudomonas*-Spezies [CLSI, 2012; EUCAST, 2012].

■: Übereinstimmung zwischen beiden Normen

Antibiotikum	Norm	Testblättchen-Konzentration [µg]	Hemmhof-durchmesser [mm]			MHK [µg/ml]		
			S	I	R	S	I	R
Piperacillin	CLSI	100	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≤ 16	32 - 64	≥ 128
	EUCAST	30	≥ 19	-	< 19	≤ 16	-	> 16
Piperacillin/Tazobactam	CLSI	100/10	≥ 21	15 - 20	≤ 14	≤ 16/4	32/4-64/4	≥ 128/4
	EUCAST	30/6	≥ 19	-	< 19	≤ 16/4	-	> 16/4
Cefotaxim	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Cefpodoxim	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Ceftazidim	CLSI	30	≥ 18	15 - 17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32
	EUCAST	10	≥ 16	-	< 16	≤ 8	-	> 8
Cefoxitin	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Imipenem	CLSI	10	≥ 19	16 - 18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
	EUCAST	10	≥ 20	17 - 19	< 17	≤ 4	8	> 8
Meropenem	CLSI	10	≥ 19	16 - 18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
	EUCAST	10	≥ 24	18 - 23	< 18	≤ 2	4 - 8	> 8
Ertapenem	CLSI	-	-	-	-	-	-	-
	EUCAST	-	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	CLSI	30	≥ 22	16 - 21	≤ 15	≤ 8	16	≥ 32
	EUCAST	30	≥ 50	17 - 49	< 16	≤ 1	2 - 16	> 16
Ciprofloxacin	CLSI	5	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
	EUCAST	5	≥ 25	22 - 24	< 22	≤ 0,5	1	> 1

Beim Vergleich der Normen von CLSI und EUCAST zeigen sich zum Teil erhebliche Unterschiede. Nur für wenige Antibiotika werden von beiden Gesellschaften die gleichen Breakpoints zur Empfindlichkeitsbestimmung festgelegt. So sind beispielsweise bei den *Enterobacteriaceae* die gleichen MHK-Breakpoints für Cefotaxim und Ertapenem und der gleiche als sensibel zu interpretierende Hemmhofdurchmesser für Cefpodoxim (≥ 21 mm) angegeben (in Tabelle 4.1 grün unterlegt). Bei *Acinetobacter* spp. sind die als resistent zu interpretierenden MHK-Bereiche von Imipenem und Meropenem, und die Breakpoints für den sensibel zu interpretierenden Bereich von Ciprofloxacin analog (in Tabelle 4.2 grün unterlegt). Bei *P. aeruginosa* haben beide Gesellschaften für Piperacillin, Piperacillin-Tazobactam, Ceftazidim und Meropenem den gleichen als sensibel zu bewertenden MHK-Bereich definiert. Für die Aztreonam-Empfindlichkeitsbestimmung ist der als resistent zu interpretierende Bereich beider Normen übereinstimmend (in Tabelle 4.3 grün unterlegt) [CLSI, 2012; EUCAST, 2012].

Insgesamt zeigt sich, dass die MHK-Breakpoints der EUCAST im Vergleich zur CLSI meist niedriger und die Breakpoints der Hemmhofdurchmesser meist höher angesetzt sind. Nur für die Empfindlichkeitsbestimmung von Imipenem und Meropenem liegen bei den *Enterobacteriaceae* die MHK-Breakpoints der EUCAST höher und die Breakpoints der Hemmhofdurchmesser im Vergleich zur CLSI-Norm niedriger (Tabelle 4.1).

In beiden Normen werden teilweise unterschiedliche Testblättchen-Konzentrationen für den Agardiffusionstest empfohlen. So liegen beispielsweise die in der CLSI-Norm festgelegten Testblättchen-Konzentrationen für Piperacillin, Cefotaxim und Ceftazidim bei *Enterobacteriaceae* und von Piperacillin, Piperacillin-Tazobactam und Ceftazidim bei *P. aeruginosa* im Vergleich zur EUCAST-Norm jeweils etwa dreimal höher (Tabellen 4.1 und 4.3).

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Normensystemen sind die Festlegungen zum Nachweis von ESBL- und Carbapenemase-bildenden Isolaten. In der CLSI-Norm wurde für *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* und *P. mirabilis* sowohl ein Eingangsscreening als auch ein phänotypischer Bestätigungstest für den ESBL-Nachweis festgelegt. Der ESBL-Bestätigungstest sollte jedoch nur aus epidemiologischen Gründen und zur Infektionskontrolle durchgeführt werden. Die Cephalosporine, Penicilline und Aztreonam sollten bei einem positiven ESBL-Test nicht therapeutisch als resistent interpretiert, sondern, wie gemessen, angegeben werden. Desweiteren empfiehlt die CLSI die Durchführung des MHT zum Nachweis von Carbapenemase-Bildung in *Enterobacteriaceae*. Dieser sollte, wie der ESBL-Bestätigungstest, nur aus epidemiologischen Gründen und zur Infektionskontrolle durchgeführt werden. Bei MHT-positiven Isolaten ist keine Angleichung der anderen Carbapeneme angezeigt. Deren Empfindlichkeiten sollen, wie gemessen, im Befund angegeben werden [CLSI, 2012].

Von der EUCAST wurden bisher weder ein ESBL-Bestätigungstest noch ein Test zum Carbapenemase-Nachweis festgelegt. Die Breakpoints der Cephalosporine und der Carbapeneme wurden so gewählt, dass alle klinisch relevanten Resistenzmechanismen detektiert werden können. Es sollten alle Antibiotika, wie gemessen, angegeben werden [EUCAST, 2012].

4.2 Klassifizierung gramnegativer Bakterien

Um die Empfehlungen zur Klassifizierung gramnegativer Bakterien nach Witte & Mielke, 2003 und Geiss *et al.*, 2003 mit der neuen Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 zu vergleichen, wurden alle vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 in der Labormedizinischen Partnerschaft nach dem Normensystem der CLSI analysierten *K. pneumoniae*-, *K. oxytoca*-, *E. cloacae*-, *Acinetobacter* spp.- und *P. aeruginosa*-Stämme mit Hilfe des Medizinischen Informationssystems von CSMed hinsichtlich ihrer Resistenzen untersucht und entsprechend der Empfehlungen in multiresistent und nicht multiresistent eingeteilt.

4.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Im Untersuchungszeitraum (01.03.2012 bis 31.05.2012) wurden 472 *K. pneumoniae*-Stämme aus den Patientenproben isoliert (Anlagen, Teil 1). 412 (87,3%) dieser Stämme wurden nach der aktuellen CLSI-Norm und der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 als nicht multiresistent eingestuft, da sie keine ESBL-Bildner sind. Allerdings wurde bei einem dieser ESBL-negativen Isolate die Bildung einer KPC-2 nachgewiesen (NRZ-03237). Bei 60 Isolaten (12,7%) wurde ESBL-Bildung detektiert (Anlagen, Teil 2). Sie wurden demzufolge als multiresistent eingestuft (Abbildung 4.1).

Würde nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 eingeteilt, wären 425 (90,1%) der 472 isolierten *K. pneumoniae*-Stämme keine MRGNE. 47 Isolate (9,9%) wären den MRGNE zuzuordnen, wobei 5 (1,1%) als resistent gegenüber allen vier Antibiotikagruppen (4 MRGNE) und 42 (8,8%) als resistent gegenüber drei Antibiotikagruppen (3 MRGNE) einzustufen sind (Anlagen, Teil 3 - 5; Abbildung 4.1). Alle als 3 MRGNE und vier der als 4 MRGNE eingestuften Isolate sind ESBL-Bildner (Anlagen, Teil 6 - 8). Bei dem anderen als 4 MRGNE eingestuften Stamm handelt es sich um die KPC-2-bildende *K. pneumoniae* (NRZ-03237).

Von den 60 ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Stämmen wären nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 vier (6,7%) als 4 MRGNE und 42 (70,0%) als 3 MRGNE einzustufen. 14 (23,3%) ESBL-Bildner wären hingegen keine MRGNE, da sie nach der CLSI-Norm sensibel gegenüber den Fluorchinolonen und Carbapenemen sind.

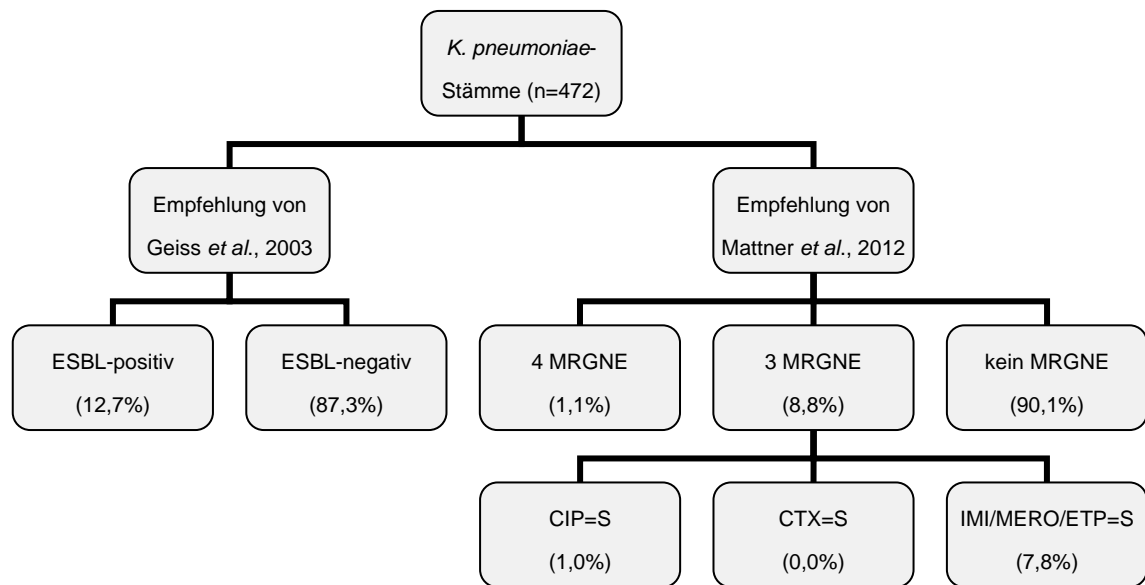


Abbildung 4.1: Klassifizierung der *Klebsiella pneumoniae*-Stämme

Einteilung der im Zeitraum vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 isolierten *K. pneumoniae*-Stämme nach den Empfehlungen von Geiss *et al.*, 2003 und Mattner *et al.*, 2012 in ESBL-positive und ESBL-negative bzw. in multiresistente und nicht multiresistente Erreger.

4 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen; 3 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen; CIP: Ciprofloxacin; CTX: Cefotaxim; IMI: Imipenem; MERO: Meropenem; ETP: Ertapenem; S: sensibel

4.2.2 *Klebsiella oxytoca*

Im Untersuchungszeitraum wurden 230 *K. oxytoca*-Stämme isoliert (Anlagen, Teil 9). Bei 13 Isolaten (5,6%) erfolgte nach der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 der Nachweis von ESBL-Bildung. Bei 217 Isolaten (94,4%) wurde diese ausgeschlossen (Anlagen, Teil 10). Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 würden 12 Isolate (5,2%) als 3 MRGNE eingestuft werden, da sie resistent gegenüber den Penicillinen, Cephalosporinen und Fluorchinolonen sind. Die Carbapeneme sind noch wirksam (Anlagen, Teil 11). Kein Isolat würde den 4 MRGNE zuzuordnen sein, da alle *K. oxytoca*-Stämme Carbapenem-sensibel getestet wurden (Abbildung 4.2).

9 (69,2%) der ESBL-bildenden *K. oxytoca*-Stämme wären nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 den 3 MRGNE zuzuordnen (Anlagen, Teil 12). Vier (30,8%) ESBL-Bildner wären keine MRGNE, da sie sensibel gegenüber den Carbapenemen und den Fluorchinolonen oder Cefotaxim sind. Drei (25%) der zu den 3 MRGNE zählenden *K. oxytoca*-Stämme sind keine ESBL-Bildner und demzufolge nach der Definition von Geiss *et al.*, 2003 nicht multiresistent. Sie sind resistent gegenüber den Penicillinen, Cephalosporinen und Fluorchinolonen, ESBL-Bildung wurde jedoch mit dem DD-Synergietest nicht nachgewiesen.

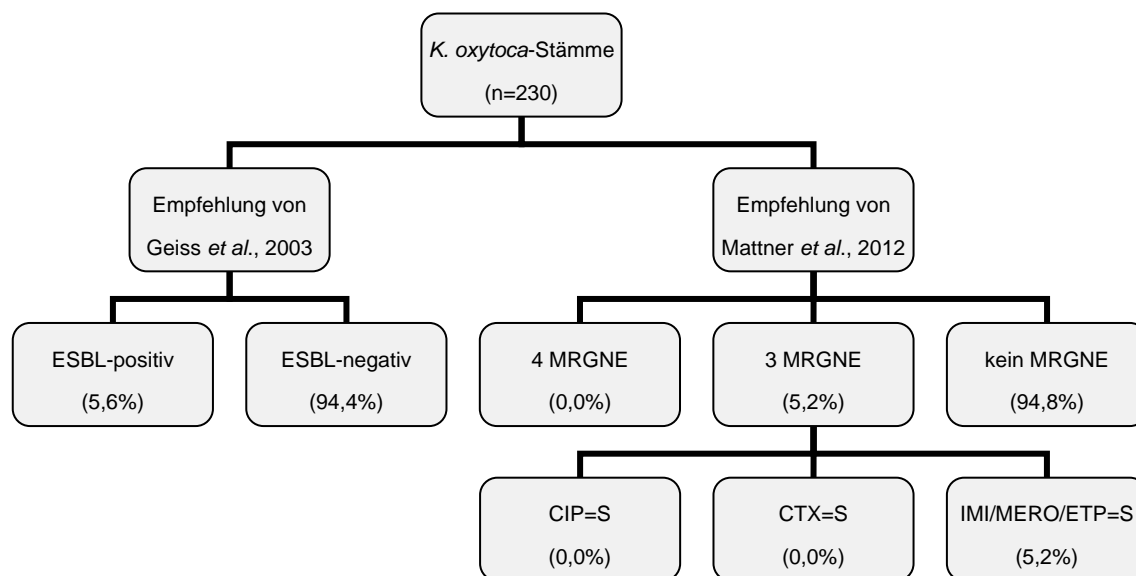


Abbildung 4.2: Klassifizierung der *Klebsiella oxytoca*-Stämme

Einteilung der im Zeitraum vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 isolierten *K. oxytoca*-Stämme nach den Empfehlungen von Geiss *et al.*, 2003 und Mattner *et al.*, 2012 in ESBL-positive und ESBL-negative bzw. in multiresistente und nicht multiresistente Erreger.

4 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen; 3 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen; CIP: Ciprofloxacin; CTX: Cefotaxim; IMI: Imipenem; MERO: Meropenem; ETP: Ertapenem; S: sensibel

4.2.3 *Enterobacter cloacae*

Aus den Patientenproben wurden im Untersuchungszeitraum 194 *E. cloacae*-Stämme isoliert (Anlagen, Teil 13). Bei sieben Isolat (3,6%) wurde nach der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 ESBL-Bildung nachgewiesen (Abbildung 4.3) (Anlagen, Teil 14).

Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären 10 Isolate (5,2%) den 3 MRGNE und, da alle Stämme Carbapenem-sensibel getestet wurden, keine den 4 MRGNE zuzuordnen (Abbildung 4.3) (Anlagen, Teil 15).

Zwei (20%) der als 3 MRGNE eingestuften *E. cloacae*-Stämme sind ESBL-Bildner (Anlagen, Teil 16). Die anderen wurden im Befund als multiresistenter Stamm mit Resistenz gegenüber den Cephalosporinen gekennzeichnet. Von den im Untersuchungszeitraum als ESBL-Bildner identifizierten *E. cloacae*-Stämme wären fünf (71,4%) nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 keine MRGNE, da sie nur gegen maximal zwei Antibiotikagruppen resistent sind.

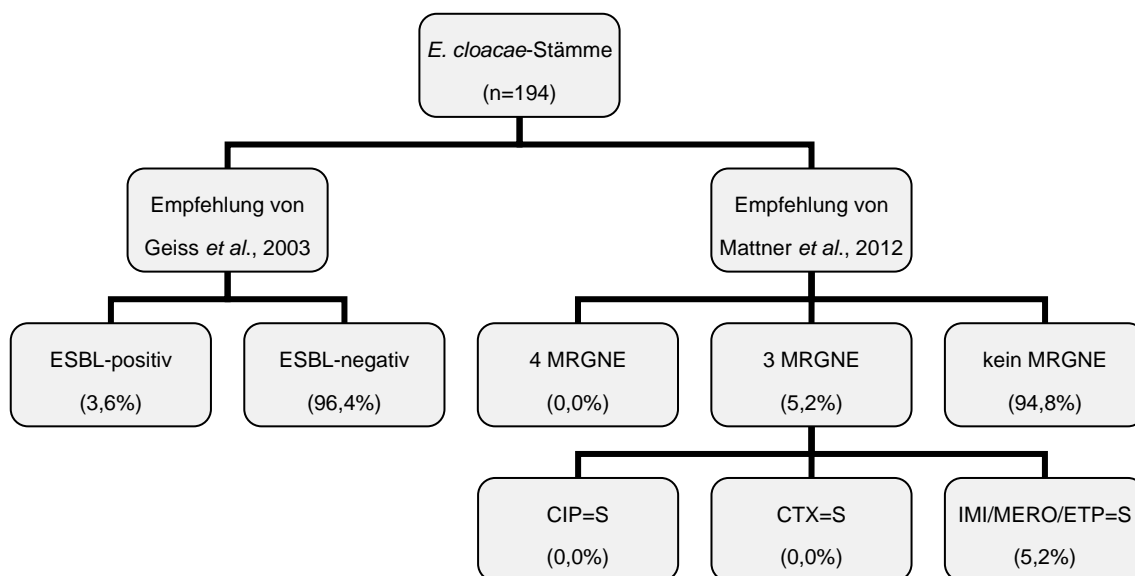


Abbildung 4.3: Klassifizierung der *Enterobacter cloacae*-Stämme

Einteilung der im Zeitraum vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 isolierten *E. cloacae*-Stämme nach den Empfehlungen von Geiss *et al.*, 2003 und Mattner *et al.*, 2012 in ESBL-positive und ESBL-negative bzw. in multiresistente und nicht multiresistente Erreger.

4 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen; 3 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen; CIP: Ciprofloxacin; CTX: Cefotaxim; IMI: Imipenem; MERO: Meropenem; ETP: Ertapenem; S: sensibel

4.2.4 *Acinetobacter* spp.

Es wurden im Untersuchungszeitraum 85 *Acinetobacter* spp.-Stämme isoliert, die alle auf der Basis der aktuellen CLSI-Norm sensibel gegenüber den Carbapenemen getestet wurden (Anlagen, Teil 17). Nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 sind sie daher nicht als multiresistent einzustufen. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären hingegen 9 Isolate (10,6%) den 3 MRGNE zuzuordnen, da sie Ciprofloxacin-resistent sind (Abbildung 4.4; Anlagen, Teil 18). Alle 3 MRGNE gehören der Spezies *A. baumannii* an.

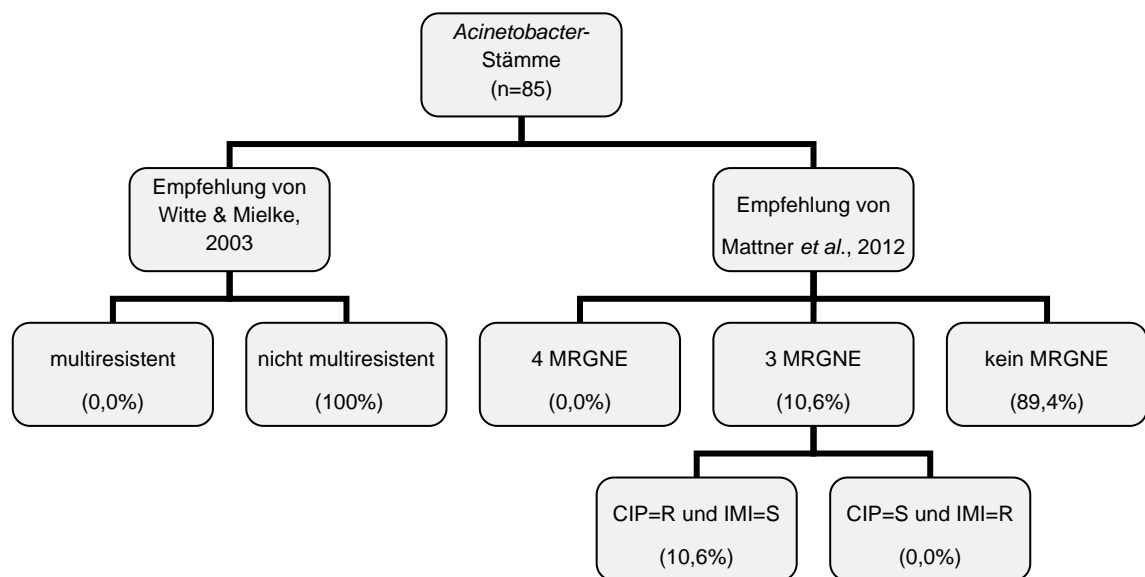


Abbildung 4.4: Einteilung der *Acinetobacter*-Stämme

Einteilung der im Zeitraum vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 isolierten *Acinetobacter*-Stämme nach den Empfehlungen von Witte & Mielke, 2003 und Mattner *et al.*, 2012 in multiresistente und nicht multiresistente Erreger.

4 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen; 3 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen; CIP: Ciprofloxacin; IMI: Imipenem; R: resistent; S: sensibel

4.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Aus den Proben wurden im Untersuchungszeitraum 448 *P. aeruginosa*-Stämme isoliert (Anlagen, Teil 19). Nach der aktuellen CLSI-Norm und der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 wurden 73 Isolate (16,3%) als multiresistent eingestuft, da sie resistent oder intermediär gegenüber Imipenem und/oder Meropenem getestet wurden. Bei 9 Isolaten (2,0%) wurde die MBL-Bildung nachgewiesen und bei 64 Isolaten (14,3%) ausgeschlossen (Anlagen, Teil 20 und 21). Die MBL-negativen Isolate besitzen demnach einen anderen Resistenzmechanismus, der zur Carbapenem-Resistenz führt. 375 (83,7%) der untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme waren Carbapenem-sensibel

und somit nicht multiresistent. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären 388 *P. aeruginosa*-Stämme (86,6%) keine MRGNE. 60 Stämme (13,4%) wären MRGNE, von denen 25 Isolate (5,6%) den 4 MRGNE und 35 (7,8%) den 3 MRGNE (11 (2,5%) Ceftazidim-sensibel, 18 (4,0%) Meropenem-sensibel und 6 (1,3%) Ciprofloxacin-sensibel) zuzuordnen sind (Abbildung 4.5; Anlagen, Teil 22 - 25).

Je nach zugrundeliegender Empfehlung werden 47 Isolate (10,5%) unterschiedlich eingeordnet. So wären 30 (6,7%) der multiresistenten, aber MBL-negativen *P. aeruginosa*-Stämme nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 keine MRGNE, da sie nur gegen maximal 2 Antibiotikagruppen resistent sind. Andererseits wurden 17 (3,8%) *P. aeruginosa*-Stämme, die nach Mattner *et al.*, 2012 zu den 3 MRGNE zählen, nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 als nicht multiresistent angegeben, da sie sensibel gegenüber den Carbapenemen sind (Anlagen, Teil 26 - 30).

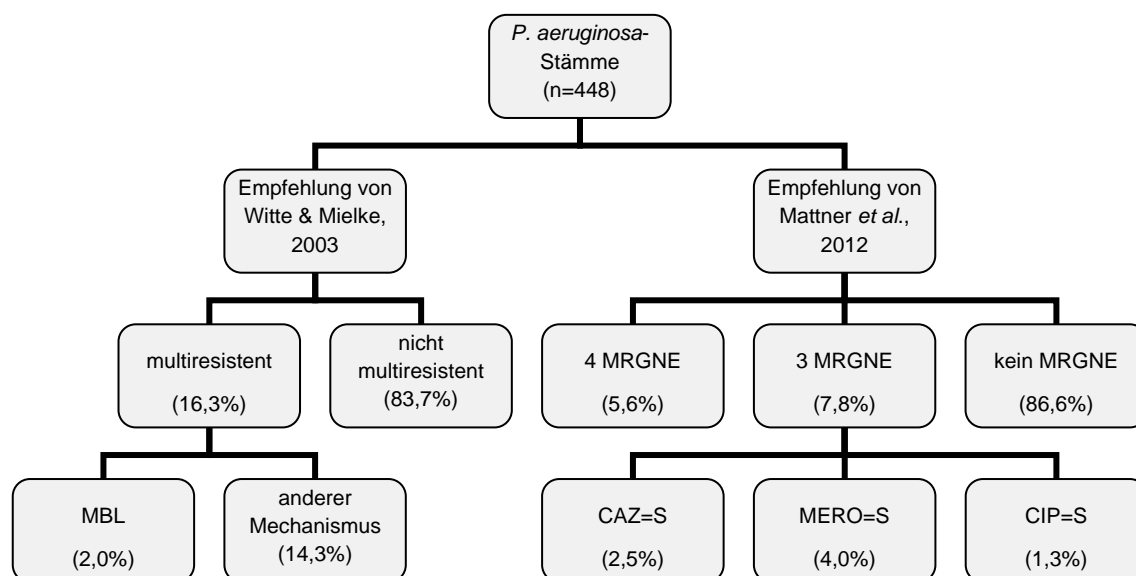


Abbildung 4.5: Klassifizierung der *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

Einteilung der im Zeitraum vom 01.03.2012 bis 31.05.2012 isolierten *P. aeruginosa*-Stämme nach den Empfehlungen von Geiss *et al.*, 2003 und Mattner *et al.*, 2012 in multiresistente und nicht multiresistente Erreger.

4 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen; 3 MRGNE: multiresistenter, gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen; CAZ: Ceftazidim; MERO: Meropenem; CIP: Ciprofloxacin; S: sensibel

Insgesamt ist die Anzahl der in dieser Arbeit als multiresistent ermittelten Erreger mit den Ergebnissen anderer Studien, beispielsweise der PEG-Resistenzstudie 2010, vergleichbar. In dieser Studie wurde die Resistenzlage im mitteleuropäischen Raum (Deutschland, Schweiz, Österreich) untersucht, wobei im stationären Bereich 8,9% der *K. pneumoniae*- und 4,4% der *P. aeruginosa*-Isolate multiresistent waren [Kresken, 2012].

4.3 Nachweis der Resistenzmechanismen

Im Folgenden wurden multiresistente Bakterienstämme und deren Resistenzmechanismen über verschiedene phänotypische Methoden im Detail analysiert. Dazu wurden multiresistente Bakterienstämme aus den während der Routinediagnostik am Laborstandort Neukirchen der Labormedizinischen Partnerschaft untersuchten Isolaten nach definierten Kriterien für die Abklärung des Resistenzmechanismus ausgewählt (Tabelle 4.4). Die Bestätigung der Keimidentifizierung erfolgte jeweils über MALDI-TOF MS (Anlagen, Teil 31 und 32).

Tabelle 4.4: Auswahlkriterien für die Durchführung der Bestätigungstests

abzuklärender Resistenzmechanismus	Auswahlkriterium [CLSI, 2012]
ESBL	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Klebsiella oxytoca</i> und <i>Escherichia coli</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • MHK für Cefpodoxim $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ • MHK für Ceftazidim, Cefotaxim, Ceftriaxon oder Aztreonam $\geq 2\mu\text{g/ml}$ <p><i>Enterobacter</i> spp. [Geiss <i>et al.</i>, 2003]</p> <ul style="list-style-type: none"> • MHK für Cefpodoxim $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ • MHK für Ceftazidim, Cefotaxim, Ceftriaxon oder Aztreonam $\geq 2\mu\text{g/ml}$
Carbapenemase	<p><i>Enterobacteriaceae</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • MHK für Ertapenem $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ (nicht bei <i>Enterobacter</i> spp.) • MHK für Meropenem $> 1 \mu\text{g/ml}$ • MHK für Imipenem $> 1 \mu\text{g/ml}$ (nicht bei <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella morganii</i> und <i>Serratia marcescens</i>) <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • MHK für Imipenem $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ • und MHK für Meropenem $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ <p><i>Acinetobacter</i> spp.</p> <ul style="list-style-type: none"> • MHK für Imipenem $> 4 \mu\text{g/ml}$ • und MHK für Meropenem $> 4 \mu\text{g/ml}$

Insgesamt wurden vier *K. pneumoniae*-Stämme, vier *K. oxytoca*-Stämme, sieben *E. cloacae*-Stämme, zwei *Acinetobacter*-Stämme und sechs *P. aeruginosa*-Stämme für die detailliertere Analyse ausgewählt. Für diese Bakterienstämme wurden sowohl über das VITEK 2- als auch über das WalkAway-System automatisierte Antibiotogramme erstellt. Die Original-Antibiotogramme sind im Archiv der Labormedizinischen Partnerschaft einsehbar. Da sich die Interpretations-Ergebnisse beider Automatenysteme prinzipiell gleichen, wird im Folgenden nicht mehr zwischen beiden Geräten unterschieden. Geringe Unterschiede der gemessenen MHK-Werte sind durch die unterschiedlichen Messmethoden der Automatenysteme bedingt. Mit den Bakterienstämmen, bei denen die Automatenysteme das Vorliegen einer ESBL bzw. erhöhte MHK-Werte für die Cephalosporine der dritten Generation ermittelten, wurde ein DD-Synergietest zum ESBL-Nachweis durchgeführt (alle *K. pneumoniae*-, *K. oxytoca*- und *E. cloacae*-Stämme). Bakterienstämme mit Resistenz oder verminderte Empfindlichkeit gegenüber den Carbapenemen wurden für die Durchführung des MHT, des MBL-Etests (Imipenem und Meropenem) und des KPC/MBL-Bestätigungstests ausgewählt (*K. pneumoniae*-Stamm 1, *E. cloacae*-Stämme 3, 4 und 7 und alle *P. aeruginosa*-Stämme), um bei ihnen das Vorliegen einer Carbapenemase nachzuweisen bzw. auszuschließen (Tabelle 4.4 und 4.5).

Tabelle 4.5: Antibiotika-Empfindlichkeiten der analysierten Bakterienstämme

Für die zur detaillierteren Analyse ausgewählten Bakterienstämme sind die durch das VITEK 2- (V) und das WalkAway-System (W) ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Cefpodoxim (CPD), Ceftazidim (CAZ), Cefotaxim (CTX), Ciprofloxacin (CIP), Imipenem (IMI), Meropenem (MERO) und Ertapenem (ETP) angegeben. Die nach der aktuellen CLSI-Norm im resistenten Bereich liegenden MHK-Werte sind **rot**, die im sensiblen Bereich liegenden sind **grün**, und die, für die keine Breakpoints festgelegt wurden, sind schwarz dargestellt [CLSI, 2012]. MHK-Werte, die ausschlaggebend für die Auswahl der Bestätigungstests waren, sind **fett**-gedruckt. *: von Expert-System korrigierte Interpretation; -: kein MHK-Wert ermittelt

Stamm-ID und -Nummer		MHK [$\mu\text{g/ml}$]						
		Cephalosporine			Chinolon	Carbapeneme		
		CPD	CAZ	CTX	CIP	IMI	MERO	ETP
<i>K. pneumoniae</i> -1	V	≥ 8	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	> 16	> 32	> 2	> 8	> 8	> 4
<i>K. pneumoniae</i> -2	V	≥ 8	2	8	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$
	W	-	4	32	≤ 1	-	≤ 1	-
<i>K. pneumoniae</i> -3	V	≥ 8	4*	≥ 64	0,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$
	W	-	16	> 32	≤ 1	-	≤ 1	-
<i>K. pneumoniae</i> -4	V	≥ 8	16	≥ 64	≥ 4	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$
	W	-	> 16	> 32	> 2	-	≤ 1	-
<i>K. oxytoca</i> -1	V	2	≤ 1	≤ 1	$\leq 0,25$	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	≤ 1	2	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 1	$\leq 0,5$
<i>K. oxytoca</i> -2	V	≥ 8	≤ 1	2	≥ 4	0,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,5$
	W	> 4	≤ 1	4	> 2	≤ 2	≤ 1	$\leq 0,5$
<i>K. oxytoca</i> -3	V	≥ 8	≤ 1	4	≥ 4	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	≤ 1	8	> 2	≤ 2	≤ 1	$\leq 0,5$
<i>K. oxytoca</i> -4	V	≥ 8	≤ 1	2	2	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	-	≤ 1	2	> 2	-	≤ 1	-
<i>E. cloacae</i> -1	V	≥ 8	4*	≥ 64	≥ 4	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	> 32	8	> 2	≤ 2	≤ 1	1
<i>E. cloacae</i> -2	V	≥ 8	$\leq 1*$	-	$\leq 0,25$	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	16	> 32	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 1	1
<i>E. cloacae</i> -3	V	≥ 8	≤ 1	≤ 1	2	2	$\leq 0,25$	-
	W	-	≤ 1	≤ 2	> 2	-	≤ 1	-
<i>E. cloacae</i> -4	V	≥ 8	2*	4	$\leq 0,25$	2	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	16	> 32	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 1	$\leq 0,5$
<i>E. cloacae</i> -5	V	≥ 8	16	≥ 64	$\leq 0,25$	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	-	8	> 32	≤ 1	-	≤ 1	-
<i>E. cloacae</i> -6	V	≥ 8	8	16	$\leq 0,25$	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	> 16	> 32	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 1	-
<i>E. cloacae</i> -7	V	≥ 8	≥ 64	≥ 64	$\leq 0,25$	> 16	> 16	≥ 8
	W	> 4	> 16	> 32	$\leq 0,5$	> 8	> 8	> 4
<i>A. Genomospezies 13 -1</i>	V	≥ 8	4	16	2	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	2	8	2	-	≤ 1	-
<i>A. baumannii</i> -2	V	≥ 8	4	-	≥ 4	≤ 1	$\leq 0,25$	-
	W	> 4	2	8	> 2	≤ 2	≤ 1	2
<i>P. aeruginosa</i> -1	V	-	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	> 16	> 32	> 2	> 8	> 8	> 4
<i>P. aeruginosa</i> -2	V	-	16	≥ 64	0,5	2	4	-
	W	> 4	> 16	> 32	2	8	> 8	> 4
<i>P. aeruginosa</i> -3	V	-	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	> 16	> 32	> 2	> 8	> 8	> 4
<i>P. aeruginosa</i> -4	V	-	16	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	16	> 32	> 2	> 8	> 8	> 4
<i>P. aeruginosa</i> -5	V	-	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	> 16	> 32	> 2	> 8	> 8	> 4
<i>P. aeruginosa</i> -6	V	-	≥ 64	≥ 64	≥ 4	≥ 16	≥ 16	-
	W	> 4	> 16	> 32	> 2	-	> 8	-

4.3.1 *Klebsiella* spp.

Der automatisierte ESBL-Bestätigungstest zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem DD-Synergietest. So konnte bei den *K. pneumoniae*-Stämmen 2, 3 und 4 und dem *K. oxytoca*-Stamm 3 das Vorliegen einer ESBL bestätigt werden. Hingegen sind die *K. oxytoca*-Stämme 1, 2 und 4 keine ESBL-Bildner. Da sie einen ähnlichen Resistenzphänotyp wie ESBL-Bildner zeigen, aber Ceftazidim-sensibel sind, wird K1-Überproduktion vermutet [Pötz *et al.*, 2004]. K1-Überproduktion wurde auch durch die Automatenysteme als möglicher Resistenzphänotyp ermittelt und angezeigt (Tabelle 4.6).

Alle untersuchten *Klebsiella*-Stämme, außer *K. pneumoniae* 1, wurden Carbapenem-sensibel getestet. Nach den in Tabelle 4.4 genannten Kriterien wäre der MHT zum Nachweis einer Carbapenemase nur mit diesem Stamm nötig gewesen. Um die Qualität des MHT zu prüfen, wurde er aber mit allen *Klebsiella*-Stämmen durchgeführt. Eine Carbapenemase-Bildung konnte bei den Carbapenem-sensiblen *Klebsiella*-Stämmen ausgeschlossen werden. Die schwach positiven MHT-Ergebnisse der *K. oxytoca*-Stämme 2 und 3 bei der Testung mit Imipenem sind vermutlich als falsch-positiv zu werten (Tabelle 4.6)

Für den *K. pneumoniae*-Stamm 1 wurde über die durchgeführten phänotypischen Tests die KPC-Bildung ermittelt. So zeigte der MHT bei der Verwendung aller drei Testblättchen das Vorliegen einer Carbapenemase an. Die durchgeführten MBL-Etests waren negativ und der KPC/MBL-Bestätigungstest zeigte die Bildung einer KPC an (Tabelle 4.6). Eine genaue Typisierung der vorliegende KPC ist phänotypisch jedoch nicht möglich. Im NRZ für gramnegative Krankenhauserreger wurde für diesen Stamm über molekularbiologische Methoden die Bildung der Carbapenemase KPC-2 nachgewiesen (NRZ-03237). Das Ergebnis des DD-Synergietests ist demnach als falsch-positiv zu werten (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Testergebnisse der *Klebsiella*-Stämme

Auswertung der phänotypischen Bestätigungstests und Angabe der Ergebnisse der Automatenysteme (VITEK 2, WalkAway) und des nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankheitserreger (NRZ). CAZ: Ceftazidim (30 µg); CAZ/CV: Ceftazidim/Clavulansäure (30/10 µg); CTX: Cefotaxim (30 µg); CTX/CV: Cefotaxim/Clavulansäure (30/10 µg); CPD: Cefpodoxim (10 µg); CPD/CV: Cefpodoxim/Clavulansäure (10/1 µg); FOX: Cefoxitin (30 µg); IMI: Imipenem (10 µg); MERO: Meropenem (10 µg); ETP: Ertapenem (10 µg); BO: Borsäure; CX: Cloxacillin; DP: Dipicolinsäure; +: positives Testergebnis; (+): schwach positives Testergebnis; -: negatives Testergebnis; n.a.: nicht auswertbar; n.d.: nicht durchgeführt

Stamm-ID Stamm-Nummer		<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Klebsiella oxytoca</i>			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Test									
		Hemmhofdurchmesser [mm]							
DD-Synergietest	CAZ	0	20	16	12	27	20	22	23
	CAZ/CV	11	22	27	26	28	22	24	25
	CTX	8	15	0	0	24	18	18	20
	CTX/CV	9	18	22	19	27	20	24	23
	CPD	0	0	0	0	16	10	10	9
	CPD/CV	0	19	21	21	18	12	14	11
	FOX	0	24	24	23	28	21	28	24
	Ergebnis	ESBL?	ESBL	ESBL	ESBL	-	-	ESBL	-
MHT	ETP	+	-	-	-	-	-	-	-
	IMI	+	-	-	-	-	(+)	(+)	-
	MERO	+	-	-	-	-	-	-	-
	Ergebnis	Carba- penemase	-	-	-	-	-	-	-
		MHK [µg/ml]							
MBL-Etest	IMI	8							
	IMI + EDTA	8							
	Ergebnis	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MERO	> 8							
	MERO + EDTA	> 2							
	Ergebnis	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		Hemmhofdurchmesser [mm]							
KPC/MBL	MERO	12							
	MERO + BO	20							
	MERO + CX	13							
	MERO + DP	14							
	Ergebnis	KPC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Automatensysteme		ESBL/Carba- penemase	ESBL	ESBL	ESBL	ESBL/ K1	ESBL/ K1	ESBL/ K1	ESBL/ K1
NRZ		KPC-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Interpretation der Testergebnisse		KPC	ESBL	ESBL	ESBL	K1	K1	ESBL	K1

4.3.2 *Enterobacter cloacae*

Der durch die Automatenysteme ermittelte ESBL-Verdacht bestätigte sich bei den *E. cloacae*-Stämme 1, 2, 3, 4, 6 und 7 nicht, da der DD-Synergietest keine Synergie zwischen den Cephalosporinen und Clavulansäure anzeigte. Bei dem *E. cloacae*-Stamm 5 wurde hingegen die ESBL-Bildung bestätigt. Es zeigte sich eine Synergie zwischen den drei getesteten Cephalosporinen und Clavulansäure (Tabelle 4.7).

Zur Qualitätskontrolle des MHTs wurde dieser mit allen, auch den Carbapenem-sensiblen *E. cloacae*-Stämmen durchgeführt. Die Stämme 1, 3, und 4 zeigten ein negatives MHT-Ergebnis, Carbapenemase-Bildung kann demnach ausgeschlossen werden. Die schwach positiven Ergebnisse bei den Stämmen 2, 5 und 6 sind vermutlich falsch-positiv, da diese Stämme Carbapenem-sensibel getestet wurden. Aufgrund der verminderten Imipenem-Empfindlichkeit erfolgten mit den *E. cloacae*-Stämmen 3 und 4 zusätzlich der MBL-Etest mit Imipenem und Meropenem und der KPC/MBL-Bestätigungstest. Die Bildung einer Carbapenemase wurde auch mit diesen Tests nicht nachgewiesen (Tabelle 4.7).

Für die *E. cloacae*-Stämme 1, 2, 3, 4 und 6 konnte mit den durchgeführten Tests kein Resistenzmechanismus ermittelt werden. Die Stämme 1, 2, 4 und 6 sind, begründet durch die hohe Cephalosporin-Resistenz, vermutlich AmpC-Überproduzenten.

Für den *E. cloacae*-Stamm 7 wurde über das KPC/MBL Bestätigungs-Kit eine AmpC-Überproduktion mit zusätzlichem Porinverlust ermittelt. Sowohl der DD-Synergietest als auch der MBL-Etest (Imipenem) waren negativ. Der MBL-Etest (Meropenem) war nicht auswertbar, da der Stamm vollständig an den Etest-Streifen heranwuchs (Tabelle 4.7). Das MHT-Ergebnis könnte aufgrund der AmpC-Überproduktion falsch positiv sein. Andererseits könnte der Stamm aber auch eine andere Carbapenemase (z.B. OXA-48) bilden, welche über die MBL-Etests und den KPC/MBL-Bestätigungstest nicht identifiziert werden kann. Der KPC/MBL-Bestätigungstest würde in diesem Fall ein falsches Ergebnis anzeigen. Der *E. cloacae*-Stamm 7 wurde zur weiteren Abklärung des vorliegenden Resistenzmechanismus an das NRZ für gramnegative Krankenhaus-erreger verschickt. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung steht zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch aus.

Tabelle 4.7: Testergebnisse der *Enterobacter cloacae*-Stämme

Auswertung der phänotypischen Bestätigungstests und Angabe der Ergebnisse der Automatenysteme (VITEK 2, WalkAway) und des nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankenhauskeimer (NRZ). CAZ: Ceftazidim (30 µg); CAZ/CV: Ceftazidim/Clavulansäure (30/10 µg); CTX: Cefotaxim (30 µg); CTX/CV: Cefotaxim/Clavulansäure (30/10 µg); CPD: Cefpodoxim (10 µg); CPD/CV: Cefpodoxim/Clavulansäure (10/1 µg); FOX: Cefoxitin (30 µg); IMI: Imipenem (10 µg); MERO: Meropenem (10 µg); ETP: Ertapenem (10 µg); BO: Borisäure; CX: Cloxacillin; DP: Dipicolinsäure; +: positives Testergebnis; (+): schwach positives Testergebnis; -: negatives Testergebnis; n.a.: nicht auswertbar; n.d.: nicht durchgeführt

Stamm-ID Stamm-Nummer		<i>Enterobacter cloacae</i>						
Test		1	2	3	4	5	6	7
DD-Synergietest	Hemmhofdurchmesser [mm]							
	CAZ	20	22	30	25	18	0	0
	CAZ/CV	14	10	30	25	30	0	0
	CTX	16	12	30	20	0	16	0
	CTX/CV	16	0	30	20	24	0	0
	CPD	0	0	20	0	0	0	0
	CPD/CV	0	0	20	0	12	0	0
	FOX	0	7	12	0	8	0	0
	Ergebnis	-	-	-	-	ESBL	-	-
MHT	ETP	-	-	-	-	-	-	+
	IMI	-	(+)	-	-	(+)	(+)	+
	MERO	-	-	-	-	-	-	(+)
	Ergebnis	-	-	-	-	-	-	Carba- penemase
MBL-Etest	MHK [µg/ml]							
	IMI			< 4	< 4			24
	IMI + EDTA			< 1	< 1			12
	Ergebnis	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	-
	MERO			0,125	< 0,125			> 8
	MERO + EDTA			0,064	0,032			> 2
	Ergebnis	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.a.
KPC/MBL	Hemmhofdurchmesser [mm]							
	MERO			34	30		28	11
	MERO + BO			32	32		28	18
	MERO + CX			30	32		30	23
	MERO + DP			32	34		28	13
	Ergebnis	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	-	AmpC + Porinverlust
Automatensysteme		ESBL/ AmpC	ESBL/ AmpC	-	ESBL/ AmpC	ESBL/ AmpC	ESBL/ AmpC	Carba- penemase
NRZ		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ausstehend
Interpretation der Testergebnisse		AmpC?	AmpC?	-	AmpC?	ESBL	AmpC?	AmpC+Po- rinverlust

4.3.3 *Acinetobacter* spp.

Über MALDI-TOF MS wurden für die *Acinetobacter*-Stämme unterschiedliche Spezies identifiziert (Anlagen, Teil 31). Bei Stamm 1 handelt es sich um *Acinetobacter* Genomospezies 13 und bei Stamm 2 um *A. baumannii*. Beide Spezies sind genetisch eng miteinander verwandt und werden zu einem *Acinetobacter-calcoaceticus*-Komplex zusammengefasst [Quinn, 1998; Howard *et al.*, 2012].

Beide *Acinetobacter*-Stämme sind nach dem DD-Synergietest keine ESBL-Bildner und nach dem MHT keine Carbapenemase-Bildner. Da sie sensibel gegenüber den Carbapenemen getestet wurden, erfolgten mit ihnen weder die MBL-Etests noch der KPC/MBL-Bestätigungstest. Es handelt sich bei beiden Stämmen im Hinblick auf die β -Lactam-Antibiotika um den Wildtyp. Dieser Phänotyp wurde auch durch die Automatenysteme ermittelt (Tabelle 4.8). Allerdings sind beide *Acinetobacter*-Stämme Ciprofloxacin-resistent und sind demnach nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 den 3 MRGNE zuzuordnen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.8: Testergebnisse der *Acinetobacter*-Stämme

Auswertung der phänotypischen Bestätigungstests und Angabe der Ergebnisse der Automatenysteme (VITEK 2, WalkAway). CAZ: Ceftazidim (30 μ g); CAZ/CV: Ceftazidim/Clavulansäure (30/10 μ g); CTX: Cefotaxim (30 μ g); CTX/CV: Cefotaxim/Clavulansäure (30/10 μ g); CPD: Cefpodoxim (10 μ g); CPD/CV: Cefpodoxim/Clavulansäure (10/1 μ g); FOX: Cefoxitin (30 μ g); IMI: Imipenem (10 μ g); MERO: Meropenem (10 μ); ETP: Ertapenem (10 μ); -: negatives Testergebnis

Stamm-ID Stamm-Nummer		<i>Acinetobacter</i> Genomospezies 13 1	<i>Acinetobacter baumannii</i> 2
Test			
DD-Synergietest		Hemmhofdurchmesser [mm]	
	CAZ	21	21
	CAZ/CV	22	21
	CTX	21	19
	CTX/CV	20	19
	CPD	13	11
	CPD/CV	12	10
	FOX	9	0
Ergebnis		-	-
MHT	ETP	-	-
	IMI	-	-
	MERO	-	-
	Ergebnis	-	-
Automatenysteme		Wildtyp	Wildtyp
Interpretation der Testergebnisse		-	-

4.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Sowohl der ESBL-Nachweis als auch der Carbapenemase-Nachweis waren bei dem *P. aeruginosa*-Stamm 1 negativ. So wuchs der Stamm beim DD-Synergietest vollständig an alle Testblättchen heran und der MHT war negativ. Der MBL-Etest (Imipenem) und der KPC/MBL-Bestätigungstest lieferten keine Hinweise auf MBL- oder KPC-Produktion. Der MBL-Etest (Meropenem) war, wie auch bei allen anderen untersuchten *P. aeruginosa*-Stämmen nicht auswertbar, da die Stämme vollständig an den Etest-Streifen heranwuchsen (Tabelle 4.9). Da der Stamm eine hohe Carbapenem-Resistenz aufweist, wurde er zur Abklärung des zugrundeliegenden Resistenzmechanismus an das NRZ für gramnegative Krankenhauserreger versendet. Dieses ermittelte über PCR das Vorliegen einer ESBL vom Typ PER-1 (NRZ-02282). Das Ergebnis des DD-Synergietests ist demnach falsch-negativ.

Für die *P. aeruginosa*-Stämme 2 und 3 konnte kein Resistenzmechanismus ermittelt werden. Sowohl die DD-Synergietests als auch die MHTs und die MBL-Etests (Imipenem) waren negativ. Auch mit dem KPC/MBL Identifikations-Kit konnte kein Resistenzmechanismus ermittelt werden (Tabelle 4.9). Die Carbapenem-Resistenz der beiden Stämme wird demnach nicht durch eine Carbapenemase, sondern durch einen anderen Resistenz-mechanismus vermittelt.

Für den *P. aeruginosa*-Stamm 4 konnte über die phänotypischen Tests eine MBL-Bildung ermittelt werden. Der MHT war zwar bei der Verwendung von Ertapenem und Meropenem negativ, aber bei der Verwendung von Imipenem schwach-positiv, der MBL-Etest (Imipenem) war positiv und der KPC/MBL-Bestätigungstest ergab MBL-Bildung (Tabelle 4.9).

Der *P. aeruginosa*-Stamm 5 zeigte einen positiven MHT, eine MBL- oder KPC-Bildung konnte jedoch über den MBL-Etest (Imipenem) und den KPC/MBL-Bestätigungstest nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch kein Hinweis auf eine AmpC-Überproduktion mit Porinverlust. Der DD-Synergietest war nicht auswertbar, da der Stamm an alle Testblättchen heranwuchs (Tabelle 4.9). Zur Abklärung des Resistenzmechanismus, ob beispielsweise eine OXA-Carbapenemase vorliegt, wurde auch der Stamm an das NRZ geschickt. Dort wurde die Bildung einer ESBL vom Typ PER-1 nachgewiesen (NRZ-04715). Das MHT-Ergebnis ist demnach als falsch-positiv und das Ergebnis des DD-Synergietest als falsch-negativ zu bewerten.

Für den *P. aeruginosa*-Stamm 6 wurde über den MHT das Vorliegen einer Carbapenemase nachgewiesen. Der MBL-Etest (Imipenem) detektierte MBL-Bildung. Mit dem KPC/MBL Identifikations-Kit wurde diese allerdings nicht bestätigt. Auch der *P. aeruginosa*-Stamm 6 wurde aufgrund seiner hohen Resistenz an das NRZ für gramnegative Krankenhauserreger versendet. Dort wurde über molekularbiologische Methoden die Produktion einer MBL vom Typ IMP-7 nachgewiesen (NRZ-00834).

Tabelle 4.9: Testergebnisse der *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

Auswertung der phänotypischen Bestätigungstests und Angabe der Ergebnisse der Automatenysteme (VITEK 2, WalkAway) und des nationalen Referenzzentrum für gramnegative Krankheitserreger (NRZ). CAZ: Ceftazidim (30 µg); CAZ/CV: Ceftazidim/Clavulansäure (30/10 µg); CTX: Cefotaxim (30 µg); CTX/CV: Cefotaxim/Clavulansäure (30/10 µg); CPD: Cefpodoxim (10 µg); CPD/CV: Cefpodoxim/Clavulansäure (10/1 µg); FOX: Cefoxitin (30 µg); IMI: Imipenem (10 µg); MERO: Meropenem (10 µg); ETP: Ertapenem (10 µg); BO: Borsäure; CX: Cloxacillin; DP: Dipicolinsäure; +: positives Testergebnis; (+): schwach positives Testergebnis; -: negatives Testergebnis; n.a.: nicht auswertbar; n.d.: nicht durchgeführt

Stamm-ID Stamm-Nummer		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
		1	2	3	4	5	6
Test							
DD-Synergietest	Hemmhofdurchmesser [mm]						
	CAZ	0	17	0	17	0	0
	CAZ/CV	0	17	0	16	0	0
	CTX	0	0	0	0	0	0
	CTX/CV	0	0	0	0	0	0
	CPD	0	0	0	0	0	0
	CPD/CV	0	0	0	0	0	0
	FOX	0	0	0	0	0	0
Ergebnis		-	-	-	-	-	-
MHT	ETP	-	-	-	-	+	+
	IMI	-	-	-	(+)	+	(+)
	MERO	-	-	-	-	(+)	(+)
	Ergebnis	-	-	-	Carba- penemase?	Carba- penemase	Carba- penemase
MBL-Etest	MHK [µg/ml]						
	IMI	32	4	48	> 256	32	> 256
	IMI + EDTA	> 64	4	> 64	12	32	32
	Ergebnis	-	-	-	MBL	-	MBL
	MERO	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8
KPC/MBL	MERO + EDTA	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
	Ergebnis	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Hemmhofdurchmesser [mm]						
KPC/MBL	MERO	9	21	9	9	9	9
	MERO + BO	9	19	9	9	9	9
	MERO + CX	9	21	9	9	9	9
	MERO + DP	11	23	13	18	12	11
Ergebnis		-	-	-	MBL	-	-
Automatensysteme		Carbapenem-Resistenz, Verdacht auf Carbapenemase-Bildung					
NRZ		PER-1	n.d.	n.d.	n.d.	PER-1	IMP-7
Interpretation der Testergebnisse		ESBL	-	-	MBL	ESBL	MBL

5 Diskussion

5.1 Methoden zum Nachweis von β -Lactamasen

5.1.1 ESBL-Nachweis

Das VITEK 2- und das WalkAway-System führen für *E. coli* und *Klebsiella* spp. einen automatisierten ESBL-Bestätigungstest nach den Normen der CLSI durch. Bei dem WalkAway-System ist dieser Test zusätzlich für *Proteus mirabilis* validiert. Der automatisierte ESBL-Bestätigungstest beruht auf der Abnahme des MHK-Wertes eines Cephalosporins (Cefotaxim, Ceftazidim oder Cefepim - nur VITEK-2 System) mit Clavulansäure im Vergleich zum Cephalosporin allein. Für andere *Enterobacteriaceae*-Spezies und nicht-*Enterobacteriaceae* ist der ESBL-Bestätigungstest nach der CLSI-Norm nicht definiert. Bei Stämmen mit ESBL-Verdacht, die kein *E. coli* oder *Klebsiella* spp. sind, wird deshalb ein DD-Synergietest zum ESBL-Nachweis durchgeführt, der auf der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 beruht. Im Unterschied zu den Automaten-Systemen wird beim DD-Synergietest auch Cefpodoxim mit und ohne Clavulansäure getestet. Nach der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 sollten bei ESBL-positiven Isolaten die Penicilline und Cephalosporine im Befund unabhängig des gemessenen MHK-Wertes als resistent bewertet werden. Nach der aktuellen CLSI-Norm hingegen wird diese Angleichung nicht empfohlen. Die MHK-Werte sollen wie gemessen angegeben und interpretiert werden [CLSI, 2012].

Obwohl der ESBL-Bestätigungstest für *Klebsiella* spp. definiert ist und eine gute Übereinstimmung zwischen dem automatisierten Bestätigungstest und dem DD-Synergietest nachgewiesen wurde (Tabelle 4.6), sind auch bei diesen Stämmen falsche Testergebnisse beschrieben. So können beispielsweise K1-überproduzierende *K. oxytoca* und KPC-2-bildende oder SHV-1-überproduzierende *K. pneumoniae* falsch-positive Ergebnisse liefern [Thomson *et al.*, 2007]. Das Ergebnis des DD-Synergietests des *K. pneumoniae*-Stamm 1 ist demnach aufgrund der KPC-2-Bildung falsch-positiv (Tabelle 4.6).

Die Automaten-Systeme ermittelten für die vier *K. oxytoca*-Stämme das Vorliegen einer ESBL bzw. den Verdacht einer K1-Überproduktion (Tabelle 4.6). Mit dem DD-Synergietest wurde ESBL-Bildung bei den Stämmen 1, 2 und 4 ausgeschlossen. Die Cephalosporin-Resistenz wurde bei diesen Stämmen nicht bzw. nur in geringem Maße durch Clavulansäure gehemmt. Sie sind demzufolge höchstwahrscheinlich K1-Überproduzenten. Für den *K. oxytoca*-Stamm 3 deutet das Ergebnis des DD-Synergietests auf eine ESBL-Bildung hin, da sich eine Synergie zwischen Clavulansäure und Cefotaxim zeigte (Tabelle 4.6). K1-Überproduzenten können jedoch falsch-positive ESBL-Bestätigungstests zeigen, welche vor allem bei der Verwendung von Cefotaxim

und Cefepim auftreten [Pötz *et al.*, 2004]. Der *K. oxytoca*-Stamm 3 könnte demzufolge auch ein K1-Überproduzent sein. Um bei *K. oxytoca* eine ESBL-Produktion von einer K1-Überproduktion zu unterscheiden, sollte man neben dem ESBL-Bestätigungstest das gesamte Antibiotogramm berücksichtigen und in die Interpretation mit einbeziehen. K1-Überproduzenten sind im Gegensatz zu ESBL-Bildnern immer Ceftazidim-sensibel und resistent gegenüber Cefuroxim, Piperacillin/Tazobactam und Aztreonam. Gegenüber Cefotaxim und Cefepim zeigen sie eine variable Resistenz [Pötz *et al.*, 2004]. Dieser Resistenzphänotyp wurde bei allen vier *K. oxytoca*-Stämmen ermittelt. Der *K. oxytoca*-Stamm 3 wäre demzufolge auch ein K1-Überproduzent, da er einen für K1-Überproduzenten typischen Resistenzphänotyp aufweist. Er ist Ceftazidim-sensibel (MHK ≤ 1 µg/ml), Cefuroxim-resistent (MHK ≥ 64 µg/ml), Aztreonam-resistent (MHK > 16 µg/ml) und resistent gegenüber Piperacillin/Tazobactam (MHK $\geq 128/4$ µg/ml). Gegenüber Cefotaxim wurde er resistent (MHK = 4 µg/ml) und gegenüber Cefepim sensibel (MHK = 8 µg/ml) gemessen (Original-Antibiogramm ist im Archiv der Labormedizinischen Partnerschaft einsehbar). Das Ergebnis des DD-Synergietests wäre demzufolge falsch-positiv, da sich die Synergie nur zwischen Clavulansäure und Cefotaxim zeigte, nicht aber zwischen Clavulansäure und Ceftazidim bzw. Cefpodoxim (Tabelle 4.6). Eine genaue Bestimmung, ob eine ESBL oder eine K1-Überproduktion vorliegt, müsste über molekularbiologischen Methoden erfolgen.

Auch andere Resistenzmechanismen können das Ergebnis des ESBL-Bestätigungstests beeinflussen. So können beispielsweise induzierbare AmpC- β -Lactamasen den Clavulansäure-basierten ESBL-Bestätigungstest beeinflussen [Pötz *et al.*, 2004]. AmpC- β -Lactamasen vermitteln wie ESBLs Cephalosporin-Resistenz, sind aber nicht bzw. nur im geringen Maße durch Clavulansäure inhibierbar [Pfeifer, 2007]. ESBL-Bildner, die zusätzlich eine AmpC- β -Lactamase produzieren, können daher falsch-negative Ergebnisse beim DD-Synergietest zeigen. Aus diesem Grund sollte zusätzlich die Empfindlichkeit von Cefoxitin ermittelt werden. Während ESBL-Bildner meist Cefoxitin-sensibel sind, sind AmpC-Produzenten Cefoxitin-resistent [Geiss *et al.*, 2003].

Da *E. cloacae*-, *P. aeruginosa*- und *Acinetobacter*-Stämme eine chromosomal kodierte AmpC- β -Lactamase besitzen, ist der Clavulansäure-basierte ESBL-Nachweis bei ihnen selten eindeutig auszuwerten [Wiegand, 2003; Howard *et al.*, 2012]. Bei den *P. aeruginosa*-Stämmen 1 und 5 wurde über molekularbiologische Methoden am NRZ für gramnegative Krankenhauserreger die Bildung einer PER-1 ESBL nachgewiesen (NRZ-02282, NRZ-04715). Diese ESBL-Bildung konnte jedoch über den DD-Synergietest nicht ermittelt werden, da die Cephalosporin-Resistenz aufgrund der gleichzeitigen AmpC-Produktion nicht durch Clavulansäure inhibiert wurde (Tabelle 4.9). Die negativen ESBL-Bestätigungstests der *P. aeruginosa*-Stämme 2, 3, und 4 und der *E. cloacae*-Stämme 1, 2, 3, 4, 6 und 7 könnten demzufolge auch falsch-negativ sein, da die AmpC- β -Lactamase das Testergebnis beeinflusst (Tabellen 4.7 und 4.9). Beim *E. cloacae*-Stamm 5 hingegen konnte trotz AmpC- β -Lactamase eine ESBL-Bildung nachgewiesen werden, da der DD-Synergietest eine durch Clavulansäure inhibierbare Cefotaxim- und Cefpodoxim-Resistenz zeigte (Tabellen 4.7).

Für eine wirksame antibakterielle Behandlung ist eine Unterscheidung zwischen ESBL-Bildung und AmpC- bzw. K1-Überproduktion nicht relevant, da die Therapieoptionen bei allen drei Resistenzmechanismen meist auf die Verwendung von Carbapenemen und Chinolonen limitiert sind [Wichelhaus, 2004/2005; Kresken *et al.*, 2010]. Aus epidemiologischer Sicht hingegen ist der ESBL-Nachweis bei gleichzeitiger AmpC- bzw. K1-Überproduktion wichtig [Tzelepi *et al.*, 2000]. Damit durch K1-Überproduktion verursachte falsch-positive ESBL-Bestätigungstests nicht auftreten, sollten diese bei möglicher K1-Überproduktion mit Ceftazidim durchgeführt werden. Jedoch eignet sich Ceftazidim nicht zum Nachweis von den in Deutschland am häufigsten vorkommenden CTX-M ESBLs. Auch der DD-Synergietest mit Cefpodoxim ermöglicht die Unterscheidung von ESBL-Bildung und K1-Überproduktion. Er ist aber wiederum für Organismen mit induzierbarer AmpC- β -Lactamase ungeeignet [Pötz *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund wird der DD-Synergietest auf Grundlage der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 mit Ceftazidim, Cefpodoxim und Cefotaxim durchgeführt. Die zusätzliche Testung von Cefepim mit und ohne Clavulansäure sollte für Bakterien mit AmpC- β -Lactamasen in Erwägung gezogen werden. Während bei AmpC-Überproduzenten Cefepim meist noch wirksam ist, zeigen ESBL-Bildner häufig einen erhöhten MHK-Wert. Dieses Verfahren wäre eine Möglichkeit zur Differenzierung von ESBL und AmpC- β -Lactamase, vor allem bei *Enterobacteriaceae* mit chromosomal kodierter AmpC- β -Lactamase [Geiss *et al.*, 2003; Pötz *et al.*, 2004]. Testblättchen mit Cefepim (30 μ g) und Clavulansäure (10 μ g) werden beispielsweise von Rosco Diagnostica und von der MAST Diagnostica GmbH angeboten. Bei nicht-*Enterobacteriaceae*, wie *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. ist ein mikrobiologischer Nachweis von ESBL-Bildung meist nicht möglich, da sie zusätzlich zu der AmpC- β -Lactamase eine natürliche Resistenz gegenüber zahlreichen Cephalosporinen aufweisen [Leclercq *et al.*, 2011]. Die Durchführung des DD-Synergietest ist bei ihnen demnach nicht sinnvoll. Ein ESBL-Nachweis sollte, wenn notwendig, molekularbiologisch erfolgen.

5.1.2 Carbapenemase-Nachweis

Die weltweite Ausbreitung verschiedener Carbapenemasen stellt ein zunehmendes infektiologisches und krankenhaushygienisches Problem dar. Da die Carbapenemase-Gene meist auf Plasmiden liegen, können sie sowohl intra- als auch interspezifisch auf andere Bakterien übertragen werden [Gatermann & Kaase, 2011; Pfeifer, 2011]. Um eine weitere Ausbreitung zu verhindern, ist der frühzeitige Nachweis Carbapenemase-bildender Bakterien notwendig.

Nach der aktuellen CLSI-Norm liegt bei *Enterobacteriaceae* bereits der Verdacht auf Carbapenemase-Bildung vor, wenn mindestens ein Carbapenem intermediär oder resistent gemessen wird, d. h. wenn für Imipenem bzw. Meropenem ein MHK $> 1 \mu\text{g/ml}$ und/oder ein Ertapenem-MHK $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ ermittelt wird. Auch ein Hemmhofdurchmesser von $\leq 21 \text{ mm}$ beim Agardiffusionstest mit Ertapenem bzw. Meropenem (jeweils 10 μg) deutet auf das Vorliegen einer Carbapenemase hin [Pasteran *et al.*,

2010; CLSI, 2012]. Ertapenem scheint dabei der sensitivste Indikator für Carbapenemase-Aktivität in *Enterobacteriaceae* zu sein [Anderson *et al.*, 2007].

Zum Carbapenemase-Nachweis in *Enterobacteriaceae* wurde von der CLSI der MHT als Carbapenemase-Bestätigungstest angegeben. Er sollte jedoch, wie der ESBL-Bestätigungstest, nur aus epidemiologischen Gründen und zur Infektionskontrolle durchgeführt werden. Bei MHT-positiven Isolaten werden die Carbapeneme nicht therapeutisch als resistent interpretiert, sondern, wie gemessen, angegeben [CLSI, 2012]. Der MHT zeigt vor allem bei der Detektion von Carbapenemasen der Ambler-Klasse A, beispielsweise KPC, eine hohe Effizienz. Die Sensitivität liegt, ungeachtet des verwendeten Testblättchens (Ertapenem, Meropenem oder Imipenem), bei etwa 0,95% [Pasteran *et al.*, 2010]. Der in dieser Arbeit untersuchte KPC-bildende *K. pneumoniae*-Stamm 1 zeigte sowohl bei der Verwendung von Ertapenem als auch bei Meropenem und Imipenem ein positives MHT-Ergebnis.

Isolate mit AmpC-Überproduktion oder vorliegender CTX-M ESBL können jedoch falsch-positive MHT-Ergebnisse bewirken [Pasteran *et al.*, 2010; Pournaras *et al.*, 2010]. So zeigten sich beispielsweise schwach-positive MHT-Ergebnisse bei der Verwendung von Imipenem-Testblättchen bei den *E. cloacae*-Stämmen 2, 5 und 6, die vermutlich auf eine AmpC-Überproduktion zurückzuführen sind. Für den *E. cloacae*-Stamm 7 wurde über das KPC/MBL Identifikations-Kit eine AmpC-Überproduktion mit Porinverlust nachgewiesen, es fanden sich hingegen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer MBL oder KPC. Die molekularbiologische Bestimmung des Resistenzmechanismus erfolgt am NRZ für gramnegative Krankenhauserreger, das Ergebnis steht aber zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch aus. Der MHT ist zum jetzigen Zeitpunkt als falsch-positiv zu bewerten (Tabelle 4.7). Auch die schwach-positiven MHT-Ergebnisse der *K. oxytoca*-Stämme 2 und 3 bei der Verwendung von Imipenem-Testblättchen scheinen durch die K1-Überproduktion falsch-positiv zu sein (Tabelle 4.6). Aufgrund der falsch-positiven Ergebnisse bei Carbapenem-sensiblen Isolaten, ist es sinnvoll den MHT ausschließlich bei erhöhten Carbapenem-MHKs durchzuführen.

Die Durchführung des MHT mit allen drei Carbapenemen ist eher aufwendig und nicht notwendig. Man sollte sich zukünftig auf ein Antibiotikum festlegen. Nach der CLSI-Norm sollte der MHT bei *Enterobacteriaceae* mit Ertapenem oder Meropenem durchgeführt werden [CLSI, 2012]. Die Durchführung des MHT mit Imipenem scheint bei *Enterobacteriaceae* nicht sinnvoll zu sein, da im Vergleich zu Meropenem und Ertapenem häufiger falsche Ergebnisse auftreten können. Meropenem weist im Vergleich zu Ertapenem eine höhere Spezifität auf (Meropenem: 0,77, Ertapenem: 0,75) [Pasteran *et al.*, 2010]. Insgesamt scheint mir die Verwendung von Meropenem-Testblättchen (10 µg) zur Durchführung des MHT bei *Enterobacteriaceae* als sinnvoll.

In der CLSI-Norm ist der MHT für nicht-*Enterobacteriaceae* bisher nicht angegeben [CLSI, 2012]. Für die analysierten *P. aeruginosa*-Stämme ergab sich, aufgrund von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen, eine nicht so gute Anwendbarkeit

des MHT. So zeigte der *P. aeruginosa*-Stamm 5, wahrscheinlich aufgrund der PER-1-ESBL-Bildung (NRZ-04715), bei Verwendung aller drei Testblättchen falsch-positive MHT-Ergebnisse. Der *P. aeruginosa*-Stamm 6 mit MBL-Bildung vom Typ IMP-7 (NRZ-00834) zeigte hingegen nur schwach-positive MHT-Ergebnisse bei der Verwendung von Imipenem und Meropenem. Der MBL-bildende *P. aeruginosa*-Stamm 4 zeigte einen negativen MHT bei der Verwendung von Ertapenem und Meropenem, und nur ein schwach-positives Ergebnis bei der Verwendung von Imipenem (Tabelle 4.9).

In der Literatur wird bei *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. für die Durchführung des MHT die Verwendung von Imipenem-Testblättchen (10 µg) beschrieben [Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003], und sollte demnach auch im Diagnostiklabor sinnvoll sein. Zur Optimierung des MHT bei *P. aeruginosa*-Isolaten wurde von Pasteran *et al.*, 2011 die Verwendung von *K. pneumoniae* ATCC 700603 anstelle von *E. coli* ATCC 25922 als Indikatorstamm vorgeschlagen. Diese als PEA-MHT bezeichnete Methode sollte auf ihre Anwendbarkeit im Routinelabor getestet werden.

Mit dem MHT können Bakterienstämme auf Carbapenemase-Aktivität gescreent werden. Eine Spezifizierung der Carbapenemase ist hingegen nicht möglich. Um im Speziellen eine MBL-Produktion nachzuweisen, bietet unter anderem die Firma bioMérieux Etests an, die auf der Hemmung der MBL durch EDTA basieren. Der MBL-Etest (Imipenem) wird bereits seit Längerem in der Routinediagnostik der Labormedizinischen Partnerschaft zum MBL-Nachweis in *P. aeruginosa*-Isolaten verwendet. Es sind jedoch falsch-positive Ergebnisse möglich, da EDTA durch Erhöhung der Zellpermeabilität eine bakterizide Wirkung aufweisen kann [Ratkai *et al.*, 2009]. Trotzdem scheint der MBL-Etest (Imipenem) eine bessere Methode für den MBL-Nachweis in *P. aeruginosa* zu sein als der MHT [Noyal *et al.*, 2009].

Für den phänotypischen Nachweis MBL-bildender *Enterobacteriaceae* ist der MBL-Etest (Imipenem) nicht zweckdienlich. Obwohl sie eine verminderte Imipenem-Empfindlichkeit zeigen, liegt der MHK meist unter 4 µg/ml. Auf dem MBL-Etest-Streifen (Imipenem) ist ein Konzentrationsgradient von 4 bis 256 µg/ml aufgebracht und eignet sich demnach nicht für den relativ niedrigen Imipenem-MHK MBL-bildender *Enterobacteriaceae* [Bogaerts *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurde für den MBL-Nachweis in *Enterobacteriaceae* der MBL-Etest (Meropenem) entwickelt, dessen Konzentrationsgradient niedriger liegt. Er soll auch für die Detektion von NDM-bildenden Stämmen geeignet sein. Im Untersuchungszeitraum (01.03.2012 bis 31.05.2012) wurden keine MBL-bildenden *Enterobacteriaceae* isoliert. Die Spezifität und Sensitivität des Tests konnte demnach nicht untersucht werden. Die drei Carbapenem-resistenten *E. cloacae*-Stämme wurden sowohl mit dem MBL-Etest (Imipenem) als auch mit dem MBL-Etest (Meropenem) MBL-negativ getestet.

Für *P. aeruginosa* ist der MBL-Etest (Meropenem) nicht geeignet. Alle getesteten *P. aeruginosa*-Stämme, auch der mit molekularbiologisch nachgewiesener MBL-Bildung (NRZ-00834), wuchsen komplett an den Etest-Streifen (Meropenem) heran und waren nicht auswertbar (Tabelle 4.9). Ein möglicher Grund dafür ist, dass die

Carbapenem-Resistenz bei *P. aeruginosa* neben MBL-Bildung auch durch andere Mechanismen vermittelt werden kann. So führt die Überproduktion verschiedener Efflux-Pumpen (MexAB-OprM, MexCD-OprJ oder MexXY-OprM) zu Meropenem- aber nicht zu Imipenem-Resistenz, da Imipenem kein Substrat dieser Efflux-Pumpen ist [Masuda *et al.*, 2000; Livermore, 2002]. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer MBL-Bildung und Überproduktion einer Efflux-Pumpe, inhibiert EDTA die MBL aber nicht die Efflux-Pumpe. Der Bakterienstamm bleibt demnach weiterhin Meropenem-resistent und der MBL-Etest (Meropenem) liefert kein auswertbares Ergebnis, da der Bakterienstamm komplett an den Etest-Streifen heranwachsen kann.

Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Differenzierung einer vorliegenden Carbapenemase ist das KPC/MBL Identifikations-Kit. Dieses wurde in dieser Arbeit für die Routinediagnostik in der Labormedizinischen Partnerschaft etabliert. Auf Grundlage der Hemmbarkeit der Carbapenemasen durch unterschiedliche Inhibitoren ermöglicht dieser Test die Differenzierung von KPC, MBL und AmpC-Überproduktion mit Porinverlust. Während MBL durch Dipicolinsäure inhibiert wird, wird KPC durch Borsäure und AmpC durch Cloxacillin inhibiert. So konnte die KPC-2-Bildung des *K. pneumoniae*-Stammes 1 durch die Borsäure-inhibierte Meropenem-Resistenz nachgewiesen werden (Tabelle 4.6). Die durch molekularbiologische Methoden bestätigte MBL-Bildung des *P. aeruginosa*-Stammes 6 (NRZ-00834) wurde hingegen nicht detektiert. Es zeigte sich zwar eine leichte Inhibierung der Meropenem-Resistenz durch Dipicolinsäure, nach Herstellerangaben sollte die Hemmhofvergrößerung jedoch mindestens 5 mm betragen, um eine MBL-Aktivität anzuzeigen. Diese Hemmhofvergrößerung zeigte sich bei dem *P. aeruginosa*-Stamm 4, bei dem auch der MBL-Etest (Imipenem) die Bildung einer MBL belegte (Tabelle 4.9). Für den *E. cloacae*-Stamm 7 wurde mit dem KPC/MBL Identifikations-Kit eine AmpC-Überproduktion mit Porinverlust ermittelt, da Cloxacillin die Meropenem-Resistenz inhibierte (Tabelle 4.7). Insgesamt zeigte sich eine gute Anwendbarkeit des KPC/MBL Identifikations-Kit, vor allem bei den *Enterobacteriaceae*. Die Einführung des MBL-Etests (Meropenem) ist demnach, bei Verwendung des KPC/MBL Identifikations-Kits, nicht notwendig. Bei *P. aeruginosa* hingegen ist zum Nachweis einer MBL der MBL-Etest (Imipenem) besser geeignet und sollte weiterhin im mikrobiologischen Diagnostiklabor verwendet werden.

In Deutschland ist OXA-48 die häufigste Carbapenemase bei *Enterobacteriaceae*, gefolgt von den KPCs. OXA-48 und KPCs werden vor allem in *K. pneumoniae* exprimiert. VIM-1 ist die dritthäufigste Carbapenemase in Deutschland und findet sich hauptsächlich in *E. cloacae* [Gatermann & Kaase, 2011; Pfeiffer, 2011]. Die häufigste Carbapenemase bei *P. aeruginosa* ist deutschlandweit VIM-2, gefolgt von den IMP-MBLs [Gatermann & Kaase, 2011]. In *Acinetobacter* spp. werden nur selten MBLs, dafür fast ausschließlich OXA-Carbapenemasen detektiert [Poirel & Nordmann, 2006]. Während MBL- und KPC-Bildung über den MHT nachgewiesen und mit dem KPC/MBL Identifikations-Kit genauer spezifiziert werden kann, ist die Identifizierung OXA-48-bildender Isolate im mikrobiologischen Labor schwierig [Giske *et al.*, 2010]. Die MHK-

Werte von Imipenem und Meropenem liegen, im Gegensatz zu Ertapenem, nicht immer im resistenten oder intermediären Bereich, wodurch das Vorliegen einer OXA-48-Carbapenemase meist auch durch die Automatenysteme nicht erkannt wird. OXA-48-bildende Stämme zeigen einen positiven MHT, die genaue Identifizierung muss aber über molekularbiologische Methoden erfolgen [Pfeifer, 2011].

5.2 Vorschlag zur Diagnostik gramnegativer Bakterien

Aus den Untersuchungsergebnissen lassen sich mögliche Abläufe für die Diagnostik im mikrobiologischen Labor ableiten. Zunächst erfolgt die Identifizierung des aus der Patientenprobe isolierten Bakterienstammes. Im Anschluss wird über ein Automaten-system ein entsprechendes Antibiotogramm für gramnegative Bakterien erstellt. Entsprechend der CLSI-Kriterien wird, wenn notwendig, ein automatisierter ESBL-Bestätigungstest durchgeführt (Tabelle 4.4). In Abhängigkeit von der Keim-Identifizierung, der gemessenen MHK-Werte und dem vom Automaten-system ermittelten wahrscheinlichsten Phänotyp unterscheidet sich das weitere diagnostische Vorgehen, wie in den Abbildungen 5.1 und 5.2 beschrieben, wie folgt:

Für *K. pneumoniae*-Stämme kann das Ergebnis des automatisierten ESBL-Bestätigungstest übernommen und im Befund wie gemessen angegeben werden. Bei ESBL-positiv getesteten *K. oxytoca*-Stämmen sollte zusätzlich immer der DD-Synergietest durchgeführt werden, da K1-Überproduktion zu falsch-positiven ESBL-Bestätigungstests führen kann. Der DD-Synergietest sollte mit Ceftazidim erfolgen, damit die falsch-positiven Ergebnisse nicht auftreten [Pötz *et al.*, 2004]. Bei *E. cloacae* sollte der DD-Synergietest hingegen nur durchgeführt werden, wenn er den Screening-Kriterien entspricht (Tabelle 4.4). Aufgrund der chromosomal kodierten, induzierbaren AmpC- β -Lactamase, sollte zusätzliche die Empfindlichkeit von Cefoxitin bestimmt und auf mögliche falsch-negative Ergebnisse geachtet werden (Abbildung 5.1).

Bei *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. ist die Durchführung des DD-Synergietests aus bereits genannten Gründen nicht sinnvoll. Ein Nachweis sollte bei durch beispielsweise phänotypisch ermittelten ESBL-Verdacht molekularbiologisch erfolgen.

Die MHK-Werte der Carbapeneme sollten bei *Enterobacteriaceae* alle im sensiblen Bereich liegen. Eine Ausnahme bilden *Enterobacter* spp., bei dem die Ertapenem-Empfindlichkeit nicht berücksichtigt werden muss. Wird mindestens ein Carbapenem resistent bzw. intermediär gemessen, sollte mit dem entsprechenden Bakterienstamm der MHT mit einem Meropenem-Testblättchen (10 μ) durchgeführt werden (Tabelle 4.4). Bei einem negativen MHT-Ergebnis, sind keine weiteren Nachweistests notwendig. Allerdings sollten nach einer Verordnung des sächsischen Staats-ministeriums für Soziales und Verbraucherschutz bis auf weiteres alle Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* an das zuständige Gesundheitsamt gemeldet werden. Bei einem positiven MHT wird der KPC/MBL-Bestätigungstest angeschlossen. Liefert

dieser kein Ergebnis, sollte der Stamm zur weiteren Abklärung an das NRZ für gramnegative Krankenhaus-erreger verschickt werden, da die Bildung einer OXA-48-Carabapenemase möglich ist [Pfeifer, 2011]. Auch MBL- oder KPC-Bildner sollten zur genaueren Typisierung an das NRZ geschickt werden. Zusätzlich ist eine Meldung der Carbapenemase-bildenden *Enterobacteriaceae* an das zuständige Gesundheitsamt erforderlich (§ 6 IfSG). Zeigt das KPC/MBL Identifikations-Kit eine AmpC-Überproduktion mit Porinverlust an, wird dies im Befund so angegeben und bedarf keiner weiteren Abklärung (Abbildung 5.1).

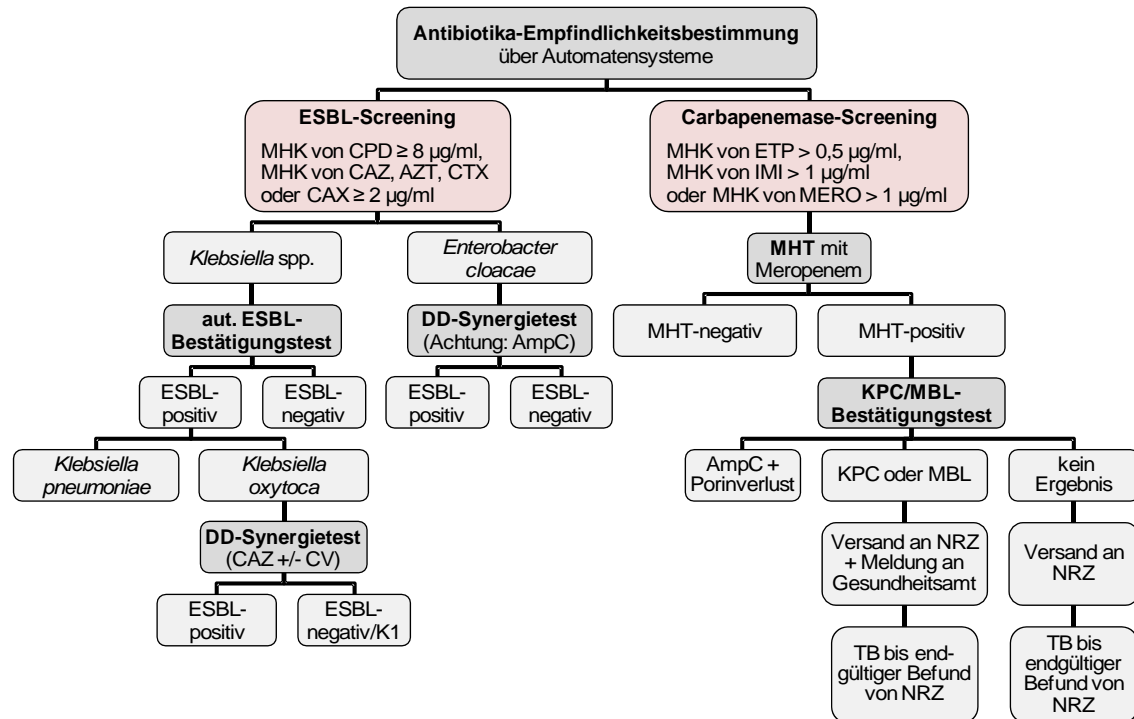


Abbildung 5.1: Arbeitsablauf der *Enterobacteriaceae*-Diagnostik

Der vorgeschlagene, schematisch dargestellte Arbeitsablauf basiert auf dem aktuellen Normensystem der CLSI.

AZT: Aztreonam; CAX: Ceftriaxon; CAZ: Ceftazidim; CPD: Cefpodoxim; CTX: Cefotaxim; CV: Clavulansäure; ETP: Ertapenem; IMI: Imipenem; MERO: Meropenem; MHK: minimale Hemmkonzentration; NRZ: Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhaus-erreger; TB: Teilbefund

Sowohl bei *P. aeruginosa* als auch bei *Acinetobacter* spp. liegt eine natürliche Ertapenem-Resistenz vor, Imipenem und Meropenem sollten hingegen sensibel sein. Zeigen Imipenem und Meropenem erhöhte MHK-Werte bedarf der entsprechende Bakterienstamm einer weiteren Abklärung (Tabelle 4.4). Da es sich bei *P. aeruginosa* beim Vorliegen einer Carbapenemase in den meisten Fällen um eine MBL handelt, sollte zunächst der MBL-Etest (Imipenem) durchgeführt werden [Rodríguez-Martínez et al., 2009]. Dieser eignet sich bei *P. aeruginosa* besser zum MBL-Nachweis als der MHT [Noyal et al., 2009]. Bei einem positiven MBL-Etest sollte der entsprechende Stamm zur genaueren Typisierung der MBL an das NRZ für gramnegative Krankenhaus-erreger geschickt werden. Einem negativen MBL-Etest wird der MHT

angeschlossen, um das Vorliegen einer anderen Carbapenemase nachzuweisen bzw. auszuschließen. Dieser sollte mit einem Imipenem-Testblättchen (10 µg) erfolgen. Ist der MHT negativ ist keine weitere Diagnostik notwendig. Stämme mit negativem MBL-Etest (Imipenem) und positivem MHT sollten auch zur weiteren Abklärung an das NRZ gesendet werden (Abbildung 5.2).

Da in *Acinetobacter* spp. am häufigsten OXA-Carbapenemasen detektiert werden [Poirel & Nordmann, 2006], ist bei dieser Gattung das Carbapenemase-Screening mit dem MHT ausreichend, wobei ein Imipenem-Testblättchen (10 µg) verwendet wird. Liefert dieser ein positives Ergebnis, sollte der *Acinetobacter*-Stamm zur genaueren Spezifizierung des Resistenzmechanismus an das NRZ für gramnegative Krankenhausreger übergeben werden (Abbildung 5.2).

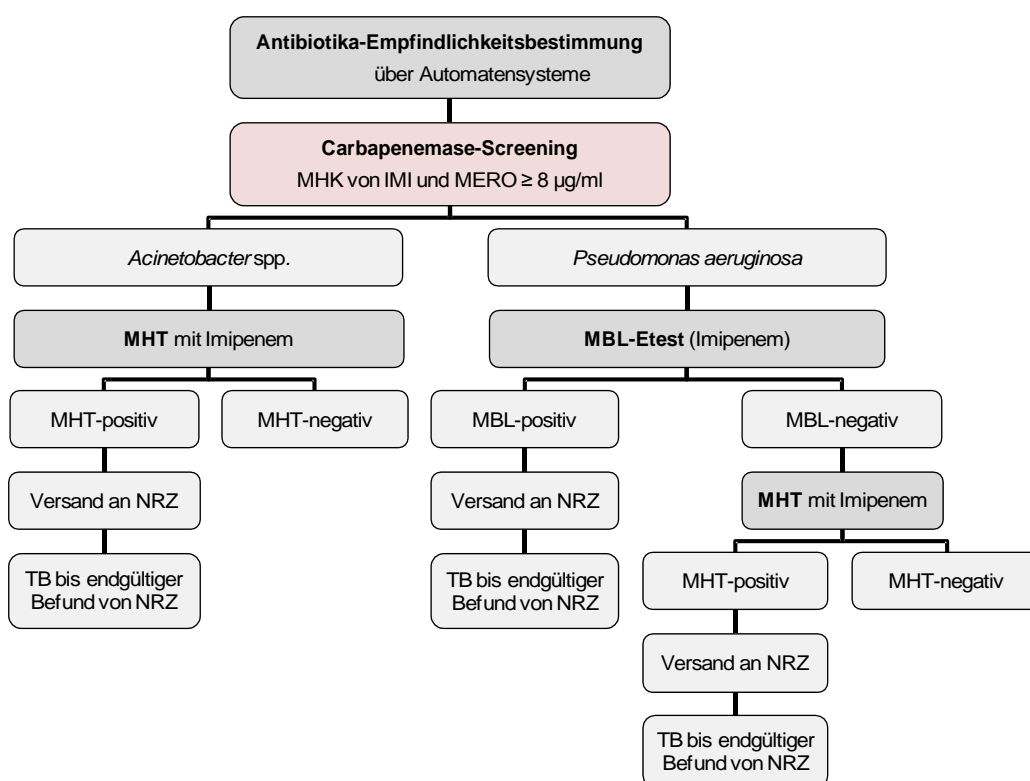


Abbildung 5.2: Carbapenemase-Diagnostik bei *Acinetobacter* spp. und *P. aeruginosa*

Der vorgeschlagene, schematisch dargestellte Arbeitsablauf basiert auf dem aktuellen Normensystem der CLSI.

IMI: Imipenem; MERO: Meropenem; MHK: minimale Hemmkonzentration; NRZ: Nationales Referenzzentrum für gramnegative Krankenhausreger; TB: Teilbefund

5.3 Klassifizierung gramnegativer Bakterien unter Verwendung der CLSI-Norm

Infektionen mit multiresistenten, gramnegativen Erregern sind im Vergleich zu nicht multiresistenten Erregern mit einer deutlich höheren Letalität verbunden. Außerdem führen sie zu einem verlängerten stationären Krankenhausaufenthalt und zu höheren Behandlungskosten [Mattner *et al.*, 2012]. Im Hinblick auf die Ausbreitung multiresistenter Erreger sind insbesondere die Carbapenemase- bzw. ESBL-Bildner von Bedeutung, deren Resistenz-Gene meist auf Plasmiden kodiert werden. Sie können über horizontalen Gentransfer auf andere Stämme der selben Bakterienspezies aber auch auf Stämme anderer Bakterienspezies übertragen werden und sich so schnell ausbreiten [Gatermann & Kaase, 2011; Richter *et al.*, 2011]. Um diese Ausbreitung zu verhindern bzw. einzudämmen, ist eine schnelle und sichere Diagnostik des zugrundeliegenden Resistenzmechanismus von großer Bedeutung. So müssen bei der Detektion eines Carbapenemase- oder ESBL-bildenden Stammes, neben der Standardhygiene weitere Maßnahmen ergriffen werden. Der betroffene Patient sollte bei einer stationären Behandlung in ein Einzelzimmer verlegt werden und die Isolation erst bei dreimalig negativen Abstrichen von allen Besiedlungsorten und frühestens zwei Tage nach Absetzen der Antibiotika-Therapie aufgehoben werden [SMS-Sachsen, 2012]. Mit Hilfe der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 sollen epidemiologisch häufig auftretende und klinisch relevante Resistenzmechanismen bei *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* und *A. baumannii* über die Empfindlichkeitsbestimmung von Leitsubstanzen erkannt werden, um dann die entsprechenden Hygienemaßnahmen einzuleiten. Die allgemeinen Hygienemaßnahmen im Krankenhaus sind dafür in drei Stufen unterteilt. Stufe I entspricht den Standardhygienemaßnahmen. Bei Stufe II ist eine zusätzliche Barriereisolation und bei Stufe III eine zusätzliche Unterbringung im Einzelzimmer oder Kohortenisolation notwendig [Mattner *et al.*, 2012]. Ob bei der Einteilung nach Mattner *et al.*, 2012 zusätzliche Tests zum Nachweis von ESBL und Carbapenemasen sinnvoll und notwendig sind, bleibt jedoch ungeklärt. Hier sollte man die regionalen Vorschriften beachten. In Deutschland besteht nach dem § 23 des Infektionsschutzgesetzes eine Aufzeichnungspflicht für Krankenhäuser über das Auftreten von nosokomialen Infektionen mit ESBL- und Carbapenemase-Bildnern. Bei gehäuftem Auftreten mit wahrscheinlichem epidemiologischen Zusammenhang besteht nach § 6 Absatz 3 des Infektionsschutzgesetzes eine nichtnamentliche Meldepflicht gegenüber dem zuständigen Gesundheitsamt [SMS-Sachsen, 2012]. Wegen des gehäuften Auftretens KPC-bildender *K. pneumoniae* müssen seit Juni 2012 nach einer Verordnung des sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz bis auf weiteres alle Carbapenem-resistenten *K. pneumoniae* an die zuständigen Gesundheitsämter gemeldet werden.

5.3.1 *Klebsiella pneumoniae*

Im Untersuchungszeitraum wurden auf Grundlage der CLSI-Norm und nach der derzeit in der Labormedizinischen Partnerschaft verwendeten Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 mehr multiresistente *K. pneumoniae*-Stämme detektiert, als es nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären. Die nach der neuen Empfehlung als MRGNE einzustufenden Stämme bilden alle, mit Ausnahme eines KPC-bildenden Stammes, eine ESBL. 1,1% der *K. pneumoniae*-Stämme würden den 4 MRGNE zuzuordnen sein, da sie als resistent gegenüber den vier Antibiotikagruppen Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Fluorchinolone zu bewerten sind. Einer dieser Stämme wurde durch das NRZ für gramnegative Krankenhausreger als KPC-2-Bildner identifiziert (NRZ-03237). Die anderen Stämme wurden anhand des ESBL-Bestätigungstests als ESBL-Bildner erkannt. Sie wurden für Ertapenem als intermediär gemessen, waren aber Meropenem- und Imipenem-sensibel. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 soll ein intermediäres Messergebnis als resistent gewertet werden, und somit auch die anderen Antibiotika dieser Gruppe, in diesem Fall die Carbapeneme. Das intermediäre Messergebnis für Ertapenem wird hier nicht durch eine Carbapenemase, sondern durch die ESBL-Produktion vermittelt. Untersuchungen zeigten, dass ESBL-Bildner häufig einen erhöhten MHK-Wert für Ertapenem zeigen. Die MHK-Werte für Imipenem und Meropenem werden durch die ESBL-Bildung hingegen nicht beeinflusst [Livermore *et al.*, 2001]. Die Angleichung der gesamten Antibiotikagruppe, wenn die Leitsubstanz als resistent bewertet wurde, widerspricht sowohl der CLSI- als auch der EUCAST-Norm. Nach denen sollten alle Antibiotika wie gemessen angegeben werden. Allerdings kann es bei Gabe anderer Antibiotika dieser Gruppe, die noch als wirksam getestet wurden, zu Therapieversagen kommen [Mattner *et al.*, 2012].

Als problematisch anzusehen sind die 23,3% der ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Stämme, die nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 keine MRGNE wären, weil sie sensibel gegenüber den Fluorchinolonen und Carbapenemen sind. Das Vorkommen von *K. pneumoniae*-Stämmen mit diesem Phänotyp wurde auch von Kizirgil *et al.*, 2005 beschrieben. Um eine Ausbreitung der ESBL-Bildner zu vermeiden, ist es demnach bei Anwendung der neuen Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 weiterhin nötig, einen ESBL-Bestätigungstest durchzuführen, damit die Fluorchinolon- und Carbapenem-sensiblen, aber ESBL-bildenden *K. pneumoniae* erkannt werden. Der ESBL-Bestätigungstest wird sowohl mit dem VITEK 2- als auch mit dem WalkAway-System automatisch durchgeführt. ESBL-Bildner werden demnach, unabhängig von ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Fluorchinolonen und Carbapenemen erkannt. Im Befund müsste auf die ESBL-Bildung hingewiesen werden, da entsprechende Hygienemaßnahmen zur Verhinderung der Ausbreitung ergriffen werden müssen [SMS-Sachsen, 2012].

5.3.2 *Klebsiella oxytoca*

Die Anzahl der als multiresistent eingestuften *K. oxytoca*-Stämme ist nach beiden Empfehlungen etwa gleich. Bei der individuellen Einordnung der einzelnen Stämme gibt es jedoch Unterschiede. So wären 30,8% der ESBL-Bildner nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 keine MRGNE, da sie sensibel gegenüber den Carbapenemen und Ciprofloxacin getestet wurden. Die Durchführung eines ESBL-Bestätigungstests ist demnach weiterhin, wie auch bei *K. pneumoniae*, sinnvoll, da diese ESBL-Bildner trotz der nicht vorliegenden Multiresistenz entsprechende Hygienemaßnahmen erfordern [Mattner *et al.*, 2012].

Bei 25% zu den 3 MRGNE zählenden Stämmen konnte eine ESBL-Bildung durch den DD-Synergietest ausgeschlossen werden. Sie wären demnach nach der Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003 als nicht multiresistent einzustufen. Diese Stämme sind vermutlich K1-Überproduzenten und erfordern nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 Hygienemaßnahmen der Stufe II.

Es wurden keine 4 MRGNE und keine Carbapenem-resistenten *K. oxytoca* isoliert. Carbapenemase-bildende *K. oxytoca* scheinen in Deutschland noch keine signifikante Rolle zu spielen. Im Zeitraum vom 01.12.2011 bis 31.03.2012 wies das NRZ für gramnegative Erreger deutschlandweit sechs *K. oxytoca*-Stämme mit MBL-Produktion (VIM-1 und VIM-2) nach, einer davon in Sachsen [Kaase, 2012]. Carbapenemase-bildende *K. oxytoca* könnten in der Labormedizinischen Partnerschaft identifiziert werden, sie wären nach beiden Empfehlungen als multiresistent einzustufen.

5.3.3 *Enterobacter cloacae*

Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 müssten mehr *E. cloacae*-Stämme als multiresistent eingestuft werden als nach der bisherigen Empfehlung von Geiss *et al.*, 2003. Bei der individuellen Einteilung gibt es bei den *E. cloacae*-Stämmen im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Spezies die meisten Unterschiede. So wären 71,4% der ESBL-bildenden Stämme nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 keine MRGNE und 80% der als 3 MRGNE einzustufenden Stämme keine ESBL-Bildner.

Die als 3 MRGNE eingestuften, aber nicht ESBL-bildenden Stämme sind vermutlich AmpC-Überproduzenten. Sie erfordern nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 Hygienemaßnahmen der Stufe II.

Da die meisten ESBL-produzierenden *E. cloacae*-Stämme nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012, nicht als MRGNE einzustufen wären, sollte der DD-Synergietests zum Nachweis einer ESBL bei ESBL-Verdacht weiterhin durchgeführt werden. Denn wie bei *Klebsiella* spp. sollten bei allen ESBL-Bildnern, auch wenn diese nicht zu den

MRGNE zählen, entsprechende Hygienemaßnahmen zur Verhinderung der Ausbreitung eingeleitet werden [Mattner *et al.*, 2012; SMS-Sachsen, 2012]. Der DD-Synergietest sollte aber aus bereits genannten Gründen mit Cefepim und Clavulansäure durchgeführt werden, um ESBL-Bildung bei gleichzeitiger AmpC-Überproduktion nachweisen zu können [Geiss *et al.*, 2003].

5.3.4 *Acinetobacter* spp.

Im Untersuchungszeitraum wurden nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 keine multiresistenten *Acinetobacter*-Stämme isoliert. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären hingegen 10,6% der *Acinetobacter*-Stämme den 3 MRGNE zuzuordnen. Diese sind als resistent gegenüber den Fluorchinolonen zu bewerten, da sie Ciprofloxacin-resistent gemessen wurden. Auch die beiden in dieser Arbeit näher analysierten *Acinetobacter*-Stämme sind nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 als nicht multiresistent eingestuft worden. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären sie hingegen den 3 MRGNE zuzuordnen, da sie Ciprofloxacin-resistent sind. Die Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 gilt allerdings nur für *A. baumannii*, sie ist für andere *Acinetobacter*-Arten nicht uneingeschränkt anwendbar. Da aber *A. baumannii* und *A. Genomospezies 13* genetisch eng verwandt sind, habe ich die Kriterien übernommen [Quinn, 1998; Howard *et al.*, 2012].

Die Fluorchinolon-Resistenz kann durch verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Eine Möglichkeit sind Mutationen in der Gyrase-Untereinheit GyrA und der Untereinheit ParC der Topoisomerase IV, die vor allem zu Ciprofloxacin-Resistenz führen. Die Aktivität neuerer Fluorchinolone wird hingegen durch diese Mutationen nur im geringen Maße beeinflusst [Wisplinghoff *et al.*, 2003]. Ein weiterer Mechanismus der Fluorchinolon-Resistenz ist die Überproduktion chromosomal kodierter Efflux-Pumpen, wie AdeABC, AdeFGH oder AdeIJK [Marchand *et al.*, 2004; Damier-Piolle *et al.*, 2008; Wieczorek *et al.*, 2008; Coyne *et al.*, 2010]. Diese sind an verschiedenen Zellfunktionen, zum Beispiel am Export von Virulenz-Determinanten und Giftstoffen, beteiligt. Sie besitzen generell ein breites Substratspektrum. Ihre Überproduktion führt unter anderem zur Resistenz gegenüber Fluorchinolone, Aminoglykoside, Tetracykline und Chloramphenicol [Coyne *et al.*, 2010].

Die Carbapenem-sensiblen zu den 3 MRGNE gehörenden *Acinetobacter* spp. erfordern im Allgemeinen Hygienemaßnahmen der Stufe II. Da die Fluorchinolon-Resistenz durch chromosomale Mutationen entsteht, ist eine Ausbreitung über horizontalen Gentransfer nicht möglich. Bei Carbapenem-resistenten bzw. bei zu den 4 MRGNE zählenden *Acinetobacter*-Stämmen werden hingegen zusätzliche Hygienemaßnahmen der Stufe III empfohlen [Mattner *et al.*, 2012]. Weltweit ist ein Anstieg der Carbapenem-resistenten *Acinetobacter* spp. zu beobachten, wobei die Resistenz bei fast allen Stämmen durch Carbapenemasen vermittelt werden [Huang *et al.*, 2010; Gatermann & Kaase, 2011]. Carbapenem-resistente Stämme wurden im Untersuchungszeitraum in

der Labormedizinischen Partnerschaft nicht isoliert. Eine signifikante Rolle bei der weltweit steigenden Carbapenem-Resistenz der *Acinetobacter* spp. spielen plasmid-kodierte MBLs (z.B. VIM, IMP, SIM) und Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen vom Typ OXA-23, OXA-24 und OXA-58. Im Gegensatz zu den MBLs vermitteln die Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen eine geringere Carbapenem-Resistenz. So wird Meropenem von ihnen meist nicht hydrolysiert [Wiegand, 2003; Poirel & Nordmann, 2006; Huang *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2012]. Welche Bedeutung die AdeABC Efflux-Pumpe bei der Carbapenem-Resistenz besitzt, wird noch diskutiert. Während verschiedene Studien eine durch AdeABC-Überproduktion vermittelte Meropenem-Resistenz belegen, zeigten Huang *et al.*, 2010, dass die AdeABC-Efflux-Pumpe bei der Carbapenem-Resistenz eine eher untergeordnete Rolle spielt [Huang *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Coyne *et al.*, 2011].

In Deutschland scheint unter den Carbapenemasen den Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen die größte Bedeutung zuzukommen. Vom 01.12.2011 bis 31.03.2012 konnten beispielsweise im NRZ für gramnegative Krankenhauserreger „nur“ zwei *Acinetobacter* spp. mit einer MBL vom Typ GIM-1 nachgewiesen werden. Carbapenem-hydrolysierende Oxacillinasen sind dagegen im selben Zeitraum bei über 100 *Acinetobacter*-Stämmen identifiziert worden [Kaase, 2012]. Wenn Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. isoliert werden, könnte das Vorliegen einer Carbapenemase über den MHT nachgewiesen werden [Lee *et al.*, 2001]. Mit dem MBL-Etest bzw. dem KPC/MBL Identifikations-Kit wäre eine genauere Bestimmung der Carbapenemase, insbesondere der Nachweis von MBL-Produktion, möglich. Die Identifikation Carbapenem-hydrolysierender Oxacillinasen könnte hingegen nur durch molekularbiologische Methoden (z.B. PCR) erfolgen.

5.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 wurden im Untersuchungszeitraum 16,3% der isolierten *P. aeruginosa*-Stämme als multiresistent eingestuft, wobei bei 2% durch den MBL-Etest (Imipenem) eine MBL-Bildung nachzuweisen war. Nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 wären es weniger, wobei 5,6% den 4 MRGNE und 7,8% den 3 MRGNE zuzuordnen wären.

Etwa jeder zehnte *P. aeruginosa*-Stamm erfährt je nach der zugrundeliegenden Empfehlung eine unterschiedliche Einteilung. Die Einordnung nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 basiert allein auf der Resistenzbestimmung der Carbapeneme, andere Antibiotikagruppen werden nicht berücksichtigt. Im Gegensatz dazu bezieht die Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 auch die Empfindlichkeitsbestimmungen der Penicilline, Fluorchinolone und Cephalosporine mit ein. *P. aeruginosa*-Stämme mit Resistenz gegenüber Penicillinen, Fluorchinolonen und Cephalosporinen würden nach Mattner *et al.*, 2012 als 3 MRGNE, nach Witte & Mielke, 2003 jedoch als nicht multiresistent eingestuft. Andererseits werden Carbapenem-

resistente *P. aeruginosa* nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 immer als multiresistent eingestuft, während sie nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 nur den MRGNE zugeordnet werden, wenn noch mindestens zwei der anderen Antibiotikagruppen als resistent ermittelt werden.

Die Carbapenem-Resistenz kann bei *P. aeruginosa* durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen bedingt sein. Neben den Carbapenemasen kann sie auch durch eine Wechselwirkung unterschiedlicher Mechanismen, wie AmpC-Überproduktion, Verlust des Porins OprD, und Überproduktion des MexAB-OprM Efflux-Systems, vermittelt werden [Quale *et al.*, 2006].

Von größter Bedeutung sind allerdings die Carbapenemasen, welche nach beiden Empfehlungen erkannt werden. So sind alle MBL-bildenden Stämme nach der Empfehlung von Witte & Mielke, 2003 multiresistent und nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 den 4 MRGNE zugeordnet. Auch die sechs in dieser Arbeit genauer analysierten *P. aeruginosa*-Stämme werden nach beiden Empfehlungen als multiresistent eingestuft.

5.4 CLSI versus EUCAST

Neben der Methode zur Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung hat auch das zu Grunde gelegte Normensystem einen entscheidenden Einfluss auf die Beurteilung des Resistenzverhaltens der untersuchten Bakterienstämme. So liegen die von der EUCAST festgelegten MHK-Breakpoints im Allgemeinen unter denen der CLSI (Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3). Die Bakterienstämme werden demzufolge eher als resistent interpretiert, d.h. bei einer Umstellung des verwendeten Normensystems von CLSI auf EUCAST ist mit einer Zunahme der multiresistenten Erreger zu rechnen. Nach Angaben der EUCAST wurden die Breakpoints so gelegt, dass alle klinisch relevanten Resistenzmechanismen erkannt, d.h. die betroffenen Antibiotika als resistent bewertet werden. Die Antibiotika-Empfindlichkeiten sollten, wie gemessen, angegeben werden. Bestätigungstests zum Nachweis von ESBL, Carbapenemasen und anderer Resistenzmechanismen definierte die EUCAST bisher nicht [Leclercq *et al.*, 2011; EUCAST, 2012]. In Deutschland besteht jedoch eine Aufzeichnungspflicht für Krankenhäuser über das Auftreten von nosokomialen Infektionen mit ESBL- und Carbapenemase-Bildnern (§ 23 des Infektionsschutzgesetzes). Außerdem besteht bei gehäuftem Auftreten mit vermutetem epidemiologischem Zusammenhang eine nichtnamentliche Meldepflicht gegenüber dem zuständigen Gesundheitsamt (§ 6 Absatz 3 des Infektionsschutzgesetzes) [SMS-Sachsen, 2012]. Ein im Februar 2012 gegründetes EUCAST-Subkomitee soll Richtlinien zum Nachweis verschiedener Resistenzmechanismen entwickeln. Diese Richtlinien werden voraussichtlich im Dezember 2012 erscheinen [EUCAST, 2012]. Um den gesetzlichen Vorschriften in Deutschland nachzukommen, müssten bei Verwendung der EUCAST-Norm zunächst die Bestätigungstests weiter nach der CLSI-Norm bzw. nach anderen Empfehlungen,

wie beispielsweise Geiss *et al.*, 2003, erfolgen. Wenn das EUCAST-Subkomitee eigene Richtlinien für die Bestätigungstests festgelegt hat, könnten dann diese integriert werden.

Besonders problematisch wäre die Umstellung auf die EUCAST-Norm im Hinblick auf die Durchführung des ESBL-Bestätigungstests und des MHT. Da die MHK-Breakpoints von Imipenem und Meropenem in der EUCAST-Norm für *Enterobacteriaceae* höher angesetzt sind, müsste der MHT basierend auf der CLSI-Norm erst bei einem Imipenem- bzw. Meropenem-MHK von $> 2 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt werden. Die MHK-Breakpoints von Ertapenem bleiben hingegen gleich (Tabelle 4.1). Der DD-Synergietest zum ESBL-Nachweis müsste bei Verwendung der EUCAST-Norm, aufgrund der niedrigeren MHK-Breakpoints, schon bei einem Cefpodoxim-MHK von $> 1 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt werden, wobei die von der CLSI vorgegebenen Testblättchenkonzentrationen verwendet werden müssen (Tabelle 4.1). Auch bei *Acinetobacter* spp. und *P. aeruginosa* müssten die Screening-Kriterien für die Durchführung des MHT entsprechend angepasst werden. So müsste der MHT bei *Acinetobacter* spp. schon ab einem MHK $> 2 \mu\text{g/ml}$ von Imipenem und Meropenem erfolgen (Tabelle 4.2). Bei *P. aeruginosa* wäre er hingegen erst bei einem Imipenem- und Meropenem-MHK von $> 8 \mu\text{g/ml}$ durchzuführen (Tabelle 4.3).

Wie Tabelle 5.1 zeigt, hätte eine Umstellung auf das Normensystem der EUCAST, trotz unterschiedlicher Breakpoints für die Leitsubstanzen keine erheblichen Auswirkungen auf die Einteilung der Bakterienstämme nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012. So werden die untersuchten *Klebsiella*-Stämme nach beiden Normen gleich klassifiziert. Die *K. pneumoniae*-Stämme 2 und 3 und der *K. oxytoca*-Stamm 1 sind jeweils, trotz ESBL-Bildung bzw. K1-Überproduktion, als nicht multiresistent einzustufen. Der *K. pneumoniae*-Stamm 4 und die *K. oxytoca*-Stämme 2, 3 und 4 werden den 3 MRGNE und der *K. pneumoniae*-Stamm 1 den 4 MRGNE zugeordnet. Auch die *E. cloacae*-Stämme 1, 2, 5, 6 und 7, werden nach beiden Normen gleich eingestuft. Die beiden *Acinetobacter*- und die sechs *P. aeruginosa*-Stämme werden, ganz gleich, welche Norm verwendet wird, den MRGNE zugeordnet. Eine unterschiedliche Klassifizierung zeigte sich nur bei den *E. cloacae*-Stämmen 3 und 4. Sie werden nur auf Grundlage der CLSI-Norm den 3 MRGNE zugeordnet. Bei Anwendung der EUCAST-Norm wären sie hingegen nicht multiresistent, da die Carbapeneme als sensibel zu interpretieren wären.

Tabelle 5.1: Einteilung der Bakterienstämme nach Mattner et al., 2012

Über die nach der CLSI- und der EUCAST-Norm ermittelten Empfindlichkeiten der jeweiligen Leitsubstanzen wurden die Penicilline (PEN), Cephalosporine (CEPH), Carbapeneme (CARB) und Fluorchinolone (FC) als resistent (R) oder sensibel (S) eingestuft.

4 MRGNE: multiresistenter gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen vier Antibiotikagruppen;
3 MRGNE: multiresistenter gramnegativer Erreger mit Resistenz gegen drei Antibiotikagruppen

Stamm-ID und -Nr.	Phänotyp	Norm	PEN	CEPH	CARB	FC	Einteilung
<i>K. pneumoniae</i> -1	KPC-2	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>K. pneumoniae</i> -2	ESBL	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>K. pneumoniae</i> -3	ESBL	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>K. pneumoniae</i> -4	ESBL	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>K. oxytoca</i> -1	K1	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>K. oxytoca</i> -2	K1	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>K. oxytoca</i> -3	ESBL/K1	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>K. oxytoca</i> -4	K1	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>E. cloacae</i> -1	-	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>E. cloacae</i> -2	-	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>E. cloacae</i> -3	-	CLSI EUCAST	R R	S S	R S	R R	3 MRGNE kein MRGNE
<i>E. cloacae</i> -4	-	CLSI EUCAST	R R	R R	R S	S S	3 MRGNE kein MRGNE
<i>E. cloacae</i> -5	ESBL	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>E. cloacae</i> -6	-	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	S S	kein MRGNE kein MRGNE
<i>E. cloacae</i> -7	AmpC mit Porinverlust	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	S S	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>A. Genomo- spezies 13</i> -1	-	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>A. baumannii</i> -2	-	CLSI EUCAST	R R	R R	S S	R R	3 MRGNE 3 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -1	PER-1	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -2	-	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -3	-	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -4	MBL	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -5	PER-1	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE
<i>P. aeruginosa</i> -6	IMP-7	CLSI EUCAST	R R	R R	R R	R R	4 MRGNE 4 MRGNE

6 Fazit und Ausblick

Um die Ausbreitung multiresistenter Erreger einzudämmen, ist man bestrebt, diese so schnell wie möglich zu diagnostizieren. Denn je früher deren Nachweis erfolgt, umso schneller können auch entsprechende Hygienemaßnahmen eingeleitet werden. Die Klassifizierung nach der Empfehlung von Mattner *et al.*, 2012 ermöglicht eine schnelle Aussage zum Multiresistenzverhalten gramnegativer Erreger. Allerdings ist diese nur in Kombination mit den ESBL- und Carbapenemase-Bestätigungstests sinnvoll, da beispielsweise ESBL-Bildner als nicht MRGNE eingestuft werden können. Nach Erstellung des Antibiotogramms kann bereits in einem Vorbefund mitgeteilt werden, ob ein MRGNE vorliegt oder nicht. Das Krankenhaus kann daraufhin die notwendigen Hygienemaßnahmen einleiten. Zur weiteren Diagnostik werden mit dem Bakterien-Isolat entsprechend der Auswahlkriterien (Tabelle 4.4) weitere Bestätigungstests durchgeführt. Deren Ergebnisse können dann als Endbefund angegeben werden.

Für die Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung kann entweder das Normensystem der CLSI oder der EUCAST verwendet werden. Allerdings sind aufgrund der teilweise verschieden festgelegten Breakpoints unterschiedliche Resistenzverteilungen zu erwarten. Kriterien und Standards zum Nachweis von ESBL und Carbapenemasen wurden bisher nur von der CLSI angegeben. Aus diesem Grund sollten, bei einer Umstellung auf die EUCAST-Norm, der ESBL- und der Carbapenemase-Nachweis zunächst weiter nach den Standards der CLSI erfolgen. In das Normensystem der EUCAST sollen im Dezember 2012 Richtlinien zum Nachweis verschiedener Resistenzmechanismen aufgenommen werden. Diese können dann gegebenenfalls übernommen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Methoden zum phänotypischen Nachweis von Carbapenemasen und ESBLs zeigten eine gute Anwendbarkeit. Vereinzelt sind jedoch Verbesserungen der Testverfahren möglich. So sollte beim DD-Synergietest zum ESBL-Nachweis in Bakterien mit AmpC- β -Lactamase die Verwendung von Cefepim mit und ohne Clavulansäure etabliert werden [Geiss *et al.*, 2003]. Der MHT könnte für *P. aeruginosa*-Isolate optimiert werden, in dem *K. pneumoniae* ATCC 700603 anstelle von *E. coli* ATCC 25922 als Indikatorstamm verwendet wird [Pasteran *et al.*, 2011].

Für einen schnelleren Carbapenemase-Nachweis wird derzeit eine neue Methode erprobt. So zeigen verschiedene Studien die Möglichkeit, Carbapenemase-Aktivität über MALDI-TOF MS nachzuweisen. Hierfür werden Imipenem, Meropenem bzw. Ertapenem und deren natürliche Abbauprodukte massenspektrometrisch detektiert und analysiert [Burckhardt & Zimmermann, 2011; Hrabák *et al.*, 2011; Kempf *et al.*, 2012]. Mit dieser Methode könnte der Carbapenemase-Nachweis innerhalb kürzester Zeit erfolgen, was ein großer Vorteil für die Eindämmung Carbapenemase-bildender Bakterien wäre.

Literaturverzeichnis

- Ambler R. P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 289(1036): 321-331
- Anderson K. F., Lonsway D. R., Rasheed J. K., Biddle J., Jensen B., McDougal L. K., Carey R. B., Thompson A., Stocker S., Limbago B. & Patel J. B. (2007) Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumonia* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 45(8): 2723-2725
- Bandt D. & Schwede I. <kontakt@imd-oderland.de>: Umstellung der Resistenztestung von CLSI auf EUCAST.
URL:<www.imd-oderland.de/einsender-fachpublikationen-labinfos-eucast.html>, verfügbar am 05.06.2012
- Baumgart A. M. K., Molinari M. A. & Silveira A. C. (2010) Prevalence of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in high complexity hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 14(5): 433-436
- bioMérieux: VITEK 2-Systems-Produktinformationen.
URL: <https://techlib.biomerieux.com/wcm/techlib/documents/LLUS/User_Manual/64034001-64035000/User_Manual_-_24308_-_VITEK_2_Systems-Product_Information_GERMAN.pdf>, verfügbar am 20.05.2012
- Bogaerts P., Engelhardt A., Berhin C., Bylund L., Ho P., Yusof A. & Glupczynski Y. (2008) Evaluation of a new meropenem-EDTA double-ended Etest strip for the detection of the CfiA metallo- β -lactamase in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Clinical Microbiology and Infection* 14(10): 973-976
- Breier A., Sohr D., Geffers C. & Gastmeier P. (2009) Erreger nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 46(4): 220-227
- Burckhardt I. & Zimmermann S. (2011) Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9): 3321-3324
- Bush K., Jacoby G. A. & Medeiros A. A. (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6): 1211-1233
- Bush K. & Jacoby G. A. (2010) Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 969-976

-
- CLSI (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. *CLSI document M100-S22* (Wayne, Pennsylvania USA: Clinical and Laboratory Standards Institute)
- Coyne S., Rosenfeld N., Lambert T., Courvalin P. & P  richon B. (2010) Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(10): 4389-4393
- Coyne S., Courvalin P. & P  richon B. (2011) Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp.. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(3): 947-953
- Damier-Piolle L., Magnet S., Br  mont S., Lambert T. & Courvalin P. (2008) AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2): 557-562
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. URL: <www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v_2.0_120101.pdf>, verf  gbar am 30.04.2012
- Gatermann S. G. & Kaase M. (2011) Nachweis von Carbapenemasen im Jahr 2010 – Bericht des NRZ f  r gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 32/2011 (Robert Koch-Institut)
- Geiss H. K., Mack D. & Seifert H. (2003) Konsensuspapier zur Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und zur Interpretation von Ergebnissen der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern. *Der Mikrobiologe* 13: 222-239
- Giske C. G., Gezelius L., Samuelsen O., Warner M., Sundsfjord A. & Woodford N. (2010) A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-  -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection* 17(4): 552-556
- Hahn H., Falke D. & Klein P.: Medizinische Mikrobiologie. - Berlin : Springer, 1991
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. & Sleator R. D. (2012) *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3(3): 243-250
- Hrab  k J., Walkov   R.,   studentov   V., Chud   kov   E. & Bergerov   T. (2011) Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9): 3222-3227

- Huang L., Sun L. Y., Xu G. B. & Xia T. A. (2008) Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62: 326-332
- Huang J., Huang J., Yu Fangyou, Wang X. & Li G. (2010) AdeABC efflux pump: Less important role in *Acinetobacter baumannii* against carbapenems. *African Journal of Microbiology Research* 4(20): 2148-2152
- Yigit H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K. & Tenover F. C. (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumonia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4): 1151-1161
- Kaase M. (2012) Carbapenemase-tragende gramnegative Erreger im Zeitraum 1. Dezember 2011 bis 31. März 2012. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 21/2012 (Robert Koch-Institut)
- Kaleem F., Usman J., Hassan A. & Khan A. (2010) Frequency and susceptibility pattern of metallo-beta-lactamase producers in a hospital in Pakistan. *Journal of Infection in Developing Countries* 4(12): 810-813
- Kanj S. S. & Kanafani Z. A. (2011) Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings* 86(3): 250-259
- Kizirgil A., Demirdaq K., Ozden M., Bulut Y., Yakupoqullari Y. & Toraman Z. A. (2005) In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* blood isolates. *Microbiological Research* 160(2): 135-140
- Kresken M., Decker-Burgard S., Drewelow B., Majcher-Peszynska J., Pletz M. W. R. & Welte T. (2010) Carbapeneme im Vergleich - Stellenwert von Doripenem. *Chemotherapie Journal* 19(5): 131-149
- Kresken M.: Venerologische und urogenitale Infektionen - Antibiotika-Empfindlichkeit von HWI-Erregern. URL: <www.peg-symposien.org/tl_files/tagungen/bad_honnef_symposium_2012/Kresken.pdf>, verfügbar am 22.08.2012
- Leclercq R., Cantón R., Brown D. F. J., Giske C. G., Heisig P., MacGowan A. P., Mouton J. W., Nordmann P., Rodloff A. C., Rossolini G. M., Soussy C.-J., Steinbakk M., Winstanley T. G. & Kahlmeter G. (2011) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x [Epub ahead of print]

- Lee K., Chong Y., Shin H. B., Kim Y. A., Yong D. & Yum J. H. (2001) Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7(2): 88-102
- Lee K., Lim Y. S., Yong D., Yum J. H. & Chong Y. (2003) Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 41(10): 4623-4629
- Livermore D. M., Oakton K. J., Carter M. W. & Warner M. (2001) Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10): 2831-2837
- Livermore D. M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* 34: 634-640
- Mammeri H., Poirel L. & Nordmann P. (2003) In vivo selection of a chromosomally encoded β -lactamase variant conferring ceftazidime resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(12): 3739-3742
- Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P. & Lambert T. (2004) Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(9): 3298-3304
- Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H. & Nishino T. (2000) Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(12): 3322-3327
- Mattner F., Bange F. C., Meyer E., Seifert H., Wichelhaus T. A. & Chaberny I. F. (2012) Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: recommendations of an expert panel of the German Society for Hygiene and Microbiology. *Deutsches Ärzteblatt Int.* 109(3): 39-45
- Mezzatesta M. L., Gona F. & Stefani S. (2012) *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology* 7: 887-902
- Neumeister B., Geiss H. K., Braun R. W. & Kimmig P.: Mikrobiologische Diagnostik : Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. - 2. vollständig überarbeitete Auflage - Stuttgart : Thieme, 2009
- Nordmann P. & Poirel L. (2002) Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* 8(6): 321-331

- Noyal M. J. C., Menezes G. A., Harish B. N., Sujatha S. & Parija S. C. (2009) Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. *Indian Journal of Medical Research* 129: 707-712
- Pasteran F., Mendez T., Rapoport M., Guerriero L. & Corso A. (2010) Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Massuda assays for detection of class A carbapenemase in species on *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *Journal of Clinical Microbiology* 48(4): 1323-1332
- Pasteran F., Veliz O., Rapoport M., Guerriero L. & Corso A. (2011) Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology* 49(12): 4301-4303
- Pfeifer Y. (2007) ESBL und AmpC: β -Laktamasen als eine Hauptursache der Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 28/2007 (Robert Koch-Institut)
- Pfeifer Y. (2011) Zum Auftreten von *Enterobacteriaceae* mit OXA-48-Carbapenemase in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 32/2011 (Robert Koch-Institut)
- Poirel L. & Nordmann P. (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 12(9): 826-836
- Potz N. A., Colman M., Warner M., Reynolds R. & Livermore D. M. (2004) False-positive extended-spectrum β -lactamase test for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(3): 545-547
- Pournaras S., Poulou A. & Tsakris A. (2010) Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 1319-1321
- Quale J., Bratu S., Gupta J. & Landman D. (2006) Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(5): 1633-1641
- Quinn J. P. (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 27(1): 117-124

- Ratkai C., Quinteira S., Grosso F., Monteiro N., Nagy E. & Peixe L. (2009) Controlling false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64(3): 657-658
- Reinhardt A., Köhler T., Wood P., Rohner P., Dumas J.-L., Ricou B. & van Delden C. (2007) Development and persistence of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a longitudinal observation in mechanically ventilated patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(4): 1341-1350
- Richter S. N., Frasson I., Bergo C., Parisi S., Cavallaro A. & Palù G. (2011) Transfer of KPC-2 carbapenemase from *Klebsiella pneumonia* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 49(5): 2040-2042
- Rodríguez-Martínez J.-M., Poirel L. & Nordmann P. (2009) Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(11): 4783-4788
- SMS-Sachsen (Staatsministerium für Soziales und Verbraucherschutz - Freistaat Sachsen): Multiresistente Erreger - Informationsbroschüre. URL: <www.gesunde.sachsen.de/download/luas/Broschuere_MRSA_SMS_Sachsen.pdf>, verfügbar am 07.04.2012
- Stille W., Brodt H.-R., Groll A. H. & Just-Nübling G.: Antibiotika-Therapie : Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. - 11. komplett aktualisierte und erweiterte Auflage - Stuttgart : Schattauer, 2005
- Theuretzbacher U. (1998) Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. *Chemotherapie Journal* 4: 136-142
- Thomson K. S., Cornish N. E., Hong S. G., Hemrick K., Herdt C. & Moland E. S. (2007) Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized β -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology* 45(8): 2380-2384
- Tonolla M., Benagli C., Rossi V., Fragosio C. & Petrini O. (2010) MALDI-TOF MS: a new laboratory option for the diagnosis of clinical infections. *Pipette* 3: 6-10
- Tzelepi E., Giakkoupi P., Sofianou D., Loukova V., Kemeroglou A. & Tsakris A. (2000) Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* 38(2): 542-546

- von Baum H., Dettenkofer M., Heeg P., Schröppel K. & Wendt C. (2010) Konsensusempfehlung Baden-Württemberg: Umgang mit Patienten mit hochresistenten Enterobakterien inklusive ESBL-Bildnern. *Hygiene & Medizin* 35: 49-55
- von Baum H., Kaase M., Meyer E., Schaumann R., Suger-Wiedeck H. & Wendt C. (2011) Definition der Multiresistenz gegenüber Antibiotika bei gramnegativen Stäbchen im Hinblick auf Maßnahmen zur Vermeidung der Weiterverbreitung. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 36/2011 (Robert Koch-Institut)
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L. & Nordmann P. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* 18(2): 306-325
- Wichelhaus T. A.: Antibiotika : Moderne Therapiekonzepte. - 1. Auflage - Bremen : UNI-MED, 2004/2005
- Wieczorek P., Sacha P., Hauschild T., Zórawski M., Krawczyk M. & Tryniszewska E. (2008) Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 46(3): 257-267
- Wiegand I. (2003) Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen. *Chemotherapie Journal* 12: 151-167
- Wisplinghoff H., Decker M., Haefs C., Krut O., Plum G. & Seifert H. (2003) Mutations in *gyrA* and *parC* associated with resistance to fluorquinolones in epidemiologically defined clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 177-180
- Witte W. & Mielke M. (2003) β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum: Grundlagen, Epidemiologie, Schlussfolgerungen für die Prävention. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 46: 881-890
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K. & Walsh T. R. (2009) Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumonia* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(12): 5046-5054

Anlagen

Teil 1	A-I
Teil 2	A-V
Teil 3	A-VI
Teil 4	A-VII
Teil 5	A-VIII
Teil 6	A-IX
Teil 7	A-X
Teil 8	A-XI
Teil 9	A-XII
Teil 10	A-XIV
Teil 11	A-XV
Teil 12	A-XVI
Teil 13	A-XVII
Teil 14	A-XIX
Teil 15	A-XX
Teil 16	A-XXI
Teil 17	A-XXII
Teil 18	A-XXIII
Teil 19	A-XXIV

Teil 20	A-XXVII
Teil 21	A-XXVIII
Teil 22	A-XXIX
Teil 23	A-XXX
Teil 24	A-XXXI
Teil 25	A-XXXII
Teil 26	A-XXXIII
Teil 27	A-XXXIV
Teil 28	A-XXXV
Teil 29	A-XXXVI
Teil 30	A-XXXVII
Teil 31	A-XXXVIII
Teil 32	A-XL

Anlagen, Teil 1

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000080922	2012-04-16	8920722122	2012-03-04	8920726988	2012-04-04
7000085943	2012-03-04	8920722158	2012-03-04	8920727137	2012-03-30
7000085984	2012-03-23	8920722235	2012-03-08	8920727195	2012-04-06
7000085985	2012-03-30	8920722277	2012-03-05	8920727372	2012-03-30
7000086832	2012-03-06	8920722534	2012-03-16	8920727552	2012-03-31
7000086940	2012-03-02	8920722647	2012-03-06	8920727760	2012-04-02
7000088888	2012-03-30	8920722839	2012-03-15	8920727800	2012-04-02
7000088895	2012-03-31	8920722840	2012-03-15	8920727987	2012-04-02
7000089342	2012-04-30	8920723109	2012-03-09	8920727989	2012-04-02
7000090783	2012-04-07	8920723524	2012-03-10	8920727990	2012-04-01
7000091415	2012-05-04	8920723634	2012-03-11	8920728028	2012-04-06
7000091497	2012-05-08	8920723858	2012-03-12	8920728068	2012-04-02
7000094687	2012-03-21	8920724020	2012-03-20	8920728308	2012-04-05
7000094788	2012-03-31	8920724024	2012-03-13	8920728674	2012-04-08
7000094856	2012-04-06	8920724042	2012-03-13	8920728676	2012-04-08
7000095045	2012-04-18	8920724146	2012-03-14	8920728760	2012-04-06
7000095071	2012-04-23	8920724187	2012-03-15	8920728881	2012-04-14
7000095315	2012-05-12	8920724276	2012-03-15	8920728911	2012-04-07
7000095494	2012-05-27	8920724301	2012-03-16	8920729020	2012-04-08
7000095498	2012-05-27	8920724338	2012-03-16	8920729123	2012-04-10
7000096312	2012-04-04	8920724542	2012-03-24	8920729183	2012-04-08
7000098849	2012-05-25	8920724585	2012-03-16	8920729236	2012-04-10
7000106236	2012-05-25	8920724774	2012-03-18	8920729238	2012-04-10
8910252344	2012-03-31	8920724869	2012-03-17	8920729262	2012-04-11
8910254361	2012-04-08	8920725297	2012-03-17	8920729273	2012-04-12
8910262110	2012-05-22	8920725430	2012-03-19	8920729817	2012-04-16
8910262451	2012-05-27	8920725539	2012-03-28	8920729909	2012-04-15
8920710604	2012-03-05	8920725659	2012-03-21	8920730133	2012-04-15
8920710911	2012-03-04	8920725697	2012-03-23	8920730358	2012-04-24
8920710947	2012-03-04	8920725755	2012-03-21	8920730384	2012-04-17
8920710994	2012-03-04	8920725783	2012-03-23	8920730531	2012-04-19
8920721059	2012-03-02	8920725934	2012-03-24	8920730669	2012-04-26
8920721096	2012-03-02	8920725951	2012-03-24	8920730819	2012-04-28
8920721601	2012-03-01	8920726200	2012-03-31	8920730824	2012-04-20
8920721634	2012-03-03	8920726378	2012-03-25	8920731042	2012-04-21
8920721882	2012-03-11	8920726413	2012-03-25	8920731195	2012-04-21
8920721935	2012-03-04	8920726596	2012-04-02	8920731235	2012-04-21
8920721940	2012-03-03	8920726707	2012-03-26	8920732646	2012-04-25
8920721949	2012-03-04	8920726744	2012-03-26	8920732904	2012-04-28
8920721962	2012-03-03	8920726826	2012-03-26	8920733173	2012-04-27
8920722058	2012-03-05	8920726955	2012-03-27	8920733214	2012-04-28
8920722110	2012-03-05	8920726956	2012-03-29	8920733470	2012-04-29

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920733936	2012-05-01	8931075006	2012-04-20	9010740667	2012-05-10
8920734001	2012-05-14	8931075012	2012-04-20	9010880263	2012-03-19
8920734002	2012-05-08	8931075028	2012-04-22	9010880294	2012-05-18
8920734171	2012-05-01	8931075031	2012-04-22	9010930774	2012-04-23
8920734327	2012-05-03	8931075199	2012-05-07	9011020484	2012-04-13
8920734457	2012-05-04	8940930099	2012-05-03	9011079623	2012-03-26
8920734489	2012-05-06	8990061375	2012-03-03	9011292504	2012-05-07
8920734514	2012-05-06	8990061537	2012-03-04	9011340560	2012-05-10
8920734759	2012-05-16	8990061908	2012-03-10	9011370428	2012-03-21
8920734791	2012-05-08	8990063016	2012-03-19	9011370431	2012-03-23
8920734833	2012-05-17	8990063366	2012-03-23	9011370475	2012-03-25
8920734861	2012-05-07	8990065184	2012-04-11	9011370488	2012-03-30
8920735096	2012-05-08	8990066050	2012-04-19	9011370637	2012-04-27
8920735098	2012-05-08	8990068931	2012-05-19	9011491229	2012-04-23
8920735127	2012-05-09	8990069331	2012-05-25	9011620665	2012-03-15
8920735301	2012-05-09	8990069847	2012-05-30	9011621322	2012-05-24
8920735351	2012-05-11	9001100477	2012-03-17	9011669181	2012-04-20
8920735502	2012-05-10	9001443562	2012-04-09	9011669328	2012-05-07
8920735509	2012-05-11	9001481123	2012-05-16	9011669409	2012-05-16
8920735605	2012-05-11	9001481273	2012-04-28	9011669423	2012-05-18
8920735612	2012-05-12	9001481301	2012-05-03	9011926482	2012-04-27
8920735880	2012-05-21	9001481344	2012-05-14	9011935606	2012-05-29
8920736135	2012-05-14	9006221414	2012-03-04	9011935608	2012-05-29
8920736372	2012-05-14	9006222015	2012-04-27	9012085379	2012-03-26
8920736476	2012-05-16	9006241569	2012-03-09	9012148516	2012-05-29
8920736612	2012-05-16	9006242174	2012-05-10	9012297573	2012-04-30
8920736697	2012-05-16	9006242186	2012-05-11	9012387223	2012-03-12
8920736752	2012-05-17	9006242194	2012-05-11	9012414564	2012-04-20
8920736989	2012-05-19	9006242194	2012-05-15	9012805154	2012-03-19
8920737099	2012-05-19	9006242270	2012-04-20	9013272020	2012-04-02
8920737225	2012-05-19	9006960714	2012-03-04	9013272341	2012-05-29
8920737344	2012-05-20	9006960827	2012-03-19	9013369017	2012-03-15
8920737413	2012-05-20	9006960911	2012-04-01	9013440654	2012-03-28
8920737452	2012-05-28	9006960955	2012-04-15	9013440659	2012-04-30
8920737455	2012-05-21	9006960988	2012-04-19	9013498945	2012-04-16
8920737482	2012-05-20	9006961073	2012-04-28	9013861979	2012-03-06
8920737486	2012-05-23	9007771823	2012-04-13	9013985112	2012-04-05
8920737495	2012-05-21	9008051183	2012-03-12	9014080151	2012-05-31
8920737496	2012-05-21	9009221441	2012-03-04	9014577843	2012-03-26
8920737497	2012-05-21	9009221773	2012-03-31	9014577967	2012-04-10
8920737499	2012-05-21	9009221778	2012-04-01	9014878251	2012-04-16
8920737696	2012-05-24	9009221917	2012-05-12	9014878316	2012-05-18
8920737718	2012-05-31	9009222118	2012-04-15	9014912090	2012-04-26
8920737734	2012-05-23	9009222215	2012-04-26	9015230084	2012-04-02
8920737852	2012-05-24	9009222234	2012-04-27	9015246408	2012-03-07
8920738193	2012-05-25	9009970002	2012-05-12	9015246645	2012-03-07
8920738246	2012-05-26	9010063424	2012-03-26	9015246718	2012-05-14
8920738253	2012-05-25	9010173602	2012-04-19	9015246784	2012-04-04
8920738348	2012-05-27	9010269095	2012-04-30	9015246943	2012-04-11
8931074384	2012-03-16	9010326787	2012-03-09	9015246979	2012-03-18
8931074472	2012-03-20	9010461589	2012-05-14	9015247160	2012-03-09
8931074485	2012-03-15	9010740507	2012-03-20	9015247161	2012-03-09
8931074974	2012-04-21	9010740514	2012-03-23	9015247292	2012-05-25
8931074985	2012-04-19	9010740623	2012-04-24	9015247293	2012-05-25

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9015247328	2012-05-22	9017995374	2012-03-12	9032628691	2012-03-12
9015247407	2012-04-10	9017995504	2012-04-02	9032628987	2012-04-23
9015247408	2012-04-10	9018554417	2012-03-06	9032740870	2012-04-25
9015247415	2012-04-11	9018554418	2012-03-04	9032943231	2012-04-30
9015247417	2012-04-11	9018554472	2012-03-09	9033080693	2012-05-21
9015247460	2012-05-18	9018554528	2012-03-13	9033520958	2012-03-08
9015247479	2012-05-03	9018554551	2012-03-16	9033521047	2012-04-23
9015247547	2012-04-28	9018554891	2012-04-06	9033521103	2012-05-18
9015247552	2012-04-27	9018555208	2012-04-27	9033624837	2012-03-27
9015247553	2012-05-14	9018555218	2012-04-27	9033625430	2012-05-10
9015247554	2012-04-28	9018555226	2012-04-27	9033625431	2012-05-11
9015247555	2012-04-27	9018555319	2012-05-06	9033733584	2012-04-02
9015247557	2012-04-28	9018555605	2012-05-26	9036117346	2012-03-10
9015247577	2012-05-30	9018710342	2012-03-02	9036117887	2012-05-21
9015247640	2012-05-14	9019023966	2012-03-08	9038723311	2012-04-20
9015247645	2012-05-25	9019043419	2012-05-11	9040212292	2012-03-06
9015247677	2012-05-22	9019043684	2012-04-16	9040212424	2012-05-11
9015247678	2012-05-22	9019043702	2012-04-19	9040298175	2012-05-11
9015247694	2012-05-24	9030053493	2012-03-07	9040298177	2012-05-14
9015247755	2012-05-23	9030053810	2012-04-16	9040315272	2012-03-09
9015247770	2012-05-23	9030054084	2012-05-29	9040315564	2012-05-14
9015247771	2012-05-22	9030054297	2012-04-20	9040422877	2012-04-23
9015247773	2012-05-22	9030063267	2012-05-09	9040517196	2012-03-23
9015247777	2012-05-24	9030074150	2012-05-17	9040635409	2012-05-15
9015247778	2012-05-24	9030170070	2012-04-20	9040792149	2012-03-12
9015247870	2012-05-28	9030426746	2012-03-23	9040882540	2012-05-07
9015264310	2012-04-05	9030449695	2012-04-30	9041318448	2012-04-30
9015409637	2012-03-02	9030470434	2012-05-29	9042008439	2012-04-23
9015409716	2012-04-02	9030540910	2012-04-19	9055261025	2012-05-18
9015409776	2012-04-30	9030600349	2012-04-10	9055290610	2012-03-16
9015530046	2012-03-26	9030610579	2012-04-30	9055781970	2012-04-24
9015545147	2012-05-28	9030828787	2012-03-23	9055940103	2012-04-23
9015867919	2012-03-19	9030986234	2012-04-30	9055940109	2012-05-11
9015867979	2012-03-26	9031237939	2012-04-23	9056572548	2012-03-27
9015935852	2012-05-04	9031237949	2012-04-23	9056752410	2012-04-21
9015935986	2012-05-21	9031299258	2012-05-18	9056753058	2012-05-25
9015936020	2012-05-29	9031342897	2012-03-16	9056781842	2012-05-25
9015978223	2012-05-18	9031342917	2012-03-28	9057380523	2012-05-15
9017000404	2012-05-14	9031451268	2012-03-02	9057790944	2012-05-29
9017055078	2012-04-02	9031451276	2012-03-06	9057862239	2012-04-19
9017055393	2012-05-08	9031451367	2012-04-30	9057930195	2012-03-20
9017197585	2012-05-07	9031557510	2012-03-06	9060092093	2012-03-07
9017325182	2012-04-13	9031778548	2012-03-06	9060100642	2012-03-17
9017325356	2012-04-23	9031778556	2012-03-12	9060100742	2012-03-23
9017325625	2012-04-30	9031779079	2012-03-23	9060100743	2012-03-23
9017325894	2012-05-10	9031779112	2012-03-27	9060100744	2012-03-23
9017329902	2012-03-26	9031976206	2012-04-23	9060100989	2012-03-01
9017332357	2012-04-30	9031976208	2012-04-23	9060101114	2012-03-13
9017517958	2012-04-23	9031976488	2012-05-24	9060101301	2012-03-11
9017652643	2012-04-24	9032049889	2012-03-12	9060104548	2012-03-21
9017692172	2012-03-12	9032160580	2012-03-08	9060108886	2012-04-25
9017816279	2012-03-09	9032183339	2012-04-05	9060108892	2012-04-25
9017932604	2012-03-19	9032561508	2012-03-19	9060108898	2012-04-18
9017932669	2012-05-07	9032597233	2012-04-16	9060108971	2012-04-29

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9060108974	2012-04-29	9060112588	2012-05-04	9132740870	2012-04-25
9060109363	2012-05-08	9111370428	2012-03-21	9132877203	2012-03-26
9060111161	2012-05-19	9111370431	2012-03-23	9132903774	2012-05-29
9060112045	2012-05-17	9111955523	2012-04-16	9140298123	2012-04-29
9060112503	2012-04-29	9113314302	2012-03-12	9140524989	2012-05-07
9060112516	2012-04-26	9130073927	2012-03-26	9142122286	2012-05-31
9060112530	2012-05-03	9130261362	2012-04-23	9156741039	2012-03-23
9060112549	2012-05-15				

Anlagen, Teil 2

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000094687	2012-03-21	8920736989	2012-05-19	9015247555	2012-04-27
7000095045	2012-04-18	8931074472	2012-03-20	9015247557	2012-04-28
7000095498	2012-05-27	8931075012	2012-04-20	9015247694	2012-05-24
8910262451	2012-05-27	9001100477	2012-03-17	9015247777	2012-05-24
8920710604	2012-03-05	9006241569	2012-03-09	9015247870	2012-05-28
8920710911	2012-03-04	9006242186	2012-05-11	9015935852	2012-05-04
8920721601	2012-03-01	9006242270	2012-04-20	9015936020	2012-05-29
8920721935	2012-03-04	9009970002	2012-05-12	9017055078	2012-04-02
8920723634	2012-03-11	9011669181	2012-04-20	9017932604	2012-03-19
8920724187	2012-03-15	9011669328	2012-05-07	9017995504	2012-04-02
8920724585	2012-03-16	9011669409	2012-05-16	9018554417	2012-03-06
8920725297	2012-03-17	9011669423	2012-05-18	9018554472	2012-03-09
8920726707	2012-03-26	9011935606	2012-05-29	9018554528	2012-03-13
8920727800	2012-04-02	9011935608	2012-05-29	9018554551	2012-03-16
8920728676	2012-04-08	9013861979	2012-03-06	9030054084	2012-05-29
8920729909	2012-04-15	9014577843	2012-03-26	9030063267	2012-05-09
8920730819	2012-04-28	9014577967	2012-04-10	9031779112	2012-03-27
8920731195	2012-04-21	9015247547	2012-04-28	9033733584	2012-04-02
8920732646	2012-04-25	9015247553	2012-05-14	9040315564	2012-05-14
8920735098	2012-05-08	9015247554	2012-04-28	9055940109	2012-05-11

Anlagen, Teil 3

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1:klepne
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP ≠ S

Labornummer	Archiv
7000086832	2012-03-06
9006241569	2012-03-09
9006242186	2012-05-11
9006242270	2012-04-20
9015936020	2012-05-29

Anlagen, Teil 4

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000094687	2012-03-21	8931075012	2012-04-20	9015247554	2012-04-28
7000095045	2012-04-18	9001100477	2012-03-17	9015247555	2012-04-27
7000095498	2012-05-27	9009970002	2012-05-12	9015935852	2012-05-04
8910262451	2012-05-27	9011669181	2012-04-20	9017932604	2012-03-19
8920721601	2012-03-01	9011669328	2012-05-07	9018554417	2012-03-06
8920723634	2012-03-11	9011669409	2012-05-16	9018554472	2012-03-09
8920724585	2012-03-16	9011935606	2012-05-29	9018554528	2012-03-13
8920726707	2012-03-26	9011935608	2012-05-29	9018554551	2012-03-16
8920727800	2012-04-02	9013861979	2012-03-06	9030054084	2012-05-29
8920728676	2012-04-08	9014577843	2012-03-26	9030063267	2012-05-09
8920729909	2012-04-15	9014577967	2012-04-10	9033733584	2012-04-02
8920731195	2012-04-21	9015247553	2012-05-14	9040315564	2012-05-14
8920735098	2012-05-08				

Anlagen, Teil 5

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP = S
- Antibiotikum4: ETP ≠ S
- Antibiotikum5: IMI ≠ S
- Antibiotikum6: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv
8920710604	2012-03-05
8920710911	2012-03-04
8920730819	2012-04-28
8920732646	2012-04-25
9031779112	2012-03-27

Anlagen, Teil 6

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1:klepne
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP ≠ S

Labornummer	Archiv
9006241569	2012-03-09
9006242186	2012-05-11
9006242270	2012-04-20
9015936020	2012-05-29

Anlagen, Teil 7

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000094687	2012-03-21	8931075012	2012-04-20	9015247554	2012-04-28
7000095045	2012-04-18	9001100477	2012-03-17	9015247555	2012-04-27
7000095498	2012-05-27	9009970002	2012-05-12	9015935852	2012-05-04
8910262451	2012-05-27	9011669181	2012-04-20	9017932604	2012-03-19
8920721601	2012-03-01	9011669328	2012-05-07	9018554417	2012-03-06
8920723634	2012-03-11	9011669409	2012-05-16	9018554472	2012-03-09
8920724585	2012-03-16	9011935606	2012-05-29	9018554528	2012-03-13
8920726707	2012-03-26	9011935608	2012-05-29	9018554551	2012-03-16
8920727800	2012-04-02	9013861979	2012-03-06	9030054084	2012-05-29
8920728676	2012-04-08	9014577843	2012-03-26	9030063267	2012-05-09
8920729909	2012-04-15	9014577967	2012-04-10	9033733584	2012-04-02
8920731195	2012-04-21	9015247553	2012-05-14	9040315564	2012-05-14
8920735098	2012-05-08				

Anlagen, Teil 8

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: klepne
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw
- Antibiotikum1: TZP \neq S
- Antibiotikum2: CTX \neq S
- Antibiotikum3: CIP = S
- Antibiotikum4: ETP \neq S
- Antibiotikum5: IMI \neq S
- Antibiotikum6: MERO \neq S

Labornummer	Archiv
8920710604	2012-03-05
8920710911	2012-03-04
8920730819	2012-04-28
8920732646	2012-04-25
9031779112	2012-03-27

Anlagen, Teil 9

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: kleoxy

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000090575	2012-03-16	8920723313	2012-03-09	8920735838	2012-05-13
7000090615	2012-03-27	8920723978	2012-03-19	8920735966	2012-05-13
7000091320	2012-04-12	8920724475	2012-03-15	8920735979	2012-05-21
7000092328	2012-04-19	8920724664	2012-03-17	8920736182	2012-05-21
7000093552	2012-03-10	8920725287	2012-03-17	8920736247	2012-05-21
7000093782	2012-03-27	8920725370	2012-03-19	8920736590	2012-05-16
7000093942	2012-04-08	8920725690	2012-03-25	8920736871	2012-05-22
7000093963	2012-04-14	8920726032	2012-03-24	8920737313	2012-05-21
7000094232	2012-03-21	8920726540	2012-03-26	8920737471	2012-05-21
7000094665	2012-03-19	8920726543	2012-03-25	8920737634	2012-05-24
7000094791	2012-04-01	8920727167	2012-03-30	8920737801	2012-05-24
7000095165	2012-04-30	8920727484	2012-03-30	8920738131	2012-05-25
7000095424	2012-05-19	8920727776	2012-04-01	8920738305	2012-05-25
7000096189	2012-03-21	8920727791	2012-04-01	8920738488	2012-05-27
7000097106	2012-04-08	8920727791	2012-04-01	8920738616	2012-05-26
7000097589	2012-05-01	8920727814	2012-04-04	8920738627	2012-05-27
7000097639	2012-05-26	8920727940	2012-04-09	8920738637	2012-05-28
7000107526	2012-05-19	8920728196	2012-04-11	8920738772	2012-05-28
7000107531	2012-05-27	8920728343	2012-04-13	8931074575	2012-03-24
7000107532	2012-05-27	8920728344	2012-04-13	8931075249	2012-05-19
7000107533	2012-05-27	8920729177	2012-04-11	8931075431	2012-05-26
8910251165	2012-03-24	8920729236	2012-04-09	8931075496	2012-05-30
8910256724	2012-04-24	8920729606	2012-04-15	8940571371	2012-05-03
8920711021	2012-03-05	8920730331	2012-04-15	8940813864	2012-03-15
8920721031	2012-03-06	8920730465	2012-04-17	8940971983	2012-03-06
8920721085	2012-03-05	8920730510	2012-04-23	8990062805	2012-03-18
8920721284	2012-03-01	8920731096	2012-04-28	8990064918	2012-04-07
8920721439	2012-03-01	8920732293	2012-04-24	8990065182	2012-04-13
8920721535	2012-03-04	8920732340	2012-04-23	8990068171	2012-05-13
8920721635	2012-03-02	8920732356	2012-04-22	8990068473	2012-05-16
8920721636	2012-03-01	8920732906	2012-05-03	9001200804	2012-05-19
8920721890	2012-03-04	8920732911	2012-04-28	9006215459	2012-05-09
8920721893	2012-03-03	8920733239	2012-05-06	9006215699	2012-05-20
8920722239	2012-03-05	8920733322	2012-04-27	9006215836	2012-04-27
8920722484	2012-03-14	8920733336	2012-05-06	9006960775	2012-03-12
8920722538	2012-03-06	8920733815	2012-05-08	9006960879	2012-03-27
8920722647	2012-03-06	8920734188	2012-05-01	9006961085	2012-05-01
8920723178	2012-03-13	8920734485	2012-05-05	9007856902	2012-04-20
8920723179	2012-03-10	8920735486	2012-05-15	9007857164	2012-05-06
8920723193	2012-03-24	8920735528	2012-05-12	9008101631	2012-05-19
8920723243	2012-03-17	8920735718	2012-05-11	9009221688	2012-03-23
8920723244	2012-03-17	8920735781	2012-05-12	9010115938	2012-05-29

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9010526832	2012-05-25	9015978140	2012-05-14	9033625035	2012-04-10
9010930813	2012-04-30	9017070967	2012-05-10	9033625467	2012-05-14
9010945650	2012-03-26	9017325023	2012-04-10	9033625514	2012-05-16
9010945727	2012-04-02	9017325655	2012-04-30	9033625515	2012-05-14
9010945919	2012-03-03	9017328913	2012-03-03	9033625604	2012-05-21
9010946390	2012-05-18	9017328986	2012-03-03	9036117802	2012-05-07
9011370440	2012-03-23	9017440738	2012-03-26	9040121980	2012-05-25
9011490982	2012-03-21	9017525673	2012-05-25	9040344657	2012-03-01
9011491308	2012-05-03	9018554509	2012-03-13	9040689455	2012-05-07
9011491386	2012-05-17	9018554715	2012-03-25	9041682053	2012-04-23
9011620842	2012-04-02	9018555021	2012-04-16	9055154009	2012-05-19
9011621230	2012-05-14	9018555083	2012-04-20	9055260961	2012-03-10
9011679827	2012-05-24	9018555133	2012-04-22	9055563960	2012-03-02
9011896871	2012-05-21	9018555416	2012-05-13	9056051197	2012-05-14
9012654963	2012-05-07	9018555532	2012-05-21	9056080067	2012-03-28
9012654993	2012-05-21	9018555571	2012-05-27	9056752325	2012-04-11
9012863519	2012-03-05	9030054382	2012-05-11	9058270060	2012-04-24
9013236660	2012-03-09	9030117573	2012-03-03	9058270078	2012-05-19
9013414860	2012-03-23	9030200010	2012-03-23	9058291349	2012-03-10
9013440656	2012-04-27	9030691008	2012-04-06	9060092208	2012-04-26
9013524964	2012-05-10	9030691965	2012-04-10	9060096657	2012-03-03
9013844162	2012-03-23	9030692252	2012-04-20	9060098656	2012-03-09
9013844179	2012-04-12	9030693250	2012-05-14	9060100039	2012-04-25
9013844180	2012-04-12	9030699445	2012-03-19	9060104063	2012-03-21
9013844197	2012-04-27	9030875576	2012-03-10	9060104264	2012-03-29
9013874804	2012-05-24	9031451270	2012-03-03	9060107462	2012-05-08
9013904006	2012-03-30	9031451277	2012-03-06	9060110120	2012-04-13
9013904038	2012-04-19	9031451292	2012-03-12	9060111758	2012-04-28
9014577773	2012-03-16	9031451313	2012-03-23	9060113973	2012-05-18
9014727910	2012-03-26	9031779159	2012-04-26	9111284909	2012-03-26
9014912182	2012-05-10	9031975852	2012-03-06	9111284910	2012-03-26
9015245861	2012-04-14	9032403090	2012-04-19	9111285001	2012-04-16
9015247171	2012-03-17	9032561952	2012-04-10	9111285002	2012-04-16
9015247468	2012-05-31	9032832156	2012-04-10	9113658839	2012-04-19
9015264143	2012-03-25	9033624879	2012-03-29		

Anlagen, Teil 10

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: kleoxy
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000093552	2012-03-10	8920727814	2012-04-04	9017328913	2012-03-03
7000093963	2012-04-14	8920733322	2012-04-27	9030875576	2012-03-10
7000096189	2012-03-21	8920735528	2012-05-12	9036117802	2012-05-07
7000107526	2012-05-19	9010945919	2012-03-03	9060113973	2012-05-18
8920721636	2012-03-01				

Anlagen, Teil 11

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: kleoxy
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000093552	2012-03-10	8920721636	2012-03-01	8920735528	2012-05-12
7000093963	2012-04-14	8920725370	2012-03-19	9010945919	2012-03-03
7000096189	2012-03-21	8920727814	2012-04-04	9015245861	2012-04-14
7000107532	2012-05-27	8920733322	2012-04-27	9017328913	2012-03-03

Anlagen, Teil 12

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: kleoxy
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw
- Antibiotikum1: TZP \neq S
- Antibiotikum2: CTX \neq S
- Antibiotikum3: CIP \neq S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000093552	2012-03-10	8920721636	2012-03-01	8920735528	2012-05-12
7000093963	2012-04-14	8920727814	2012-04-04	9010945919	2012-03-03
7000096189	2012-03-21	8920733322	2012-04-27	9017328913	2012-03-03

Anlagen, Teil 13

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: entclc
- Keim2: entclo
- Keim3: entcpx

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000083913	2012-03-23	8920729304	2012-04-17	8920737319	2012-05-20
7000085201	2012-03-06	8920729390	2012-04-11	8920737362	2012-05-24
7000086996	2012-03-01	8920730009	2012-04-15	8920737376	2012-05-20
7000089201	2012-04-29	8920730192	2012-04-19	8920737457	2012-05-23
7000089202	2012-04-21	8920730684	2012-04-21	8920737577	2012-05-22
7000089897	2012-03-03	8920730993	2012-04-24	8920737618	2012-05-29
7000089929	2012-03-03	8920731090	2012-04-29	8920737695	2012-05-24
7000094142	2012-03-21	8920732635	2012-04-25	8920738456	2012-05-27
7000094443	2012-05-20	8920732913	2012-05-04	8920738575	2012-05-27
7000094887	2012-04-10	8920732926	2012-04-29	8920738619	2012-05-31
7000096438	2012-04-22	8920733191	2012-04-29	8920738705	2012-05-28
7000098691	2012-05-22	8920733205	2012-04-29	8920739061	2012-05-30
7000106258	2012-05-26	8920733205	2012-04-29	8931074986	2012-04-20
8910256612	2012-04-23	8920733782	2012-05-01	8931075101	2012-04-29
8910256612	2012-04-23	8920733958	2012-05-02	8931075133	2012-05-10
8910261076	2012-05-19	8920734099	2012-05-11	8931075160	2012-05-03
8910261076	2012-05-19	8920734192	2012-05-11	8931075249	2012-05-19
8920721488	2012-03-04	8920734286	2012-05-06	8931075378	2012-05-25
8920721656	2012-03-07	8920734485	2012-05-06	8940055952	2012-05-08
8920722112	2012-03-03	8920734485	2012-05-05	8940571362	2012-04-22
8920723207	2012-03-16	8920734485	2012-05-06	8940813846	2012-03-13
8920723209	2012-03-16	8920734511	2012-05-06	8990061372	2012-03-03
8920723386	2012-03-10	8920734655	2012-05-16	8990061537	2012-03-04
8920723674	2012-03-19	8920734656	2012-05-12	8990061966	2012-03-18
8920724302	2012-03-17	8920734885	2012-05-15	8990064137	2012-04-01
8920725174	2012-03-18	8920734885	2012-05-08	8990064146	2012-04-02
8920725367	2012-03-21	8920734984	2012-05-08	8990064944	2012-04-08
8920725507	2012-03-29	8920735264	2012-05-11	8990066398	2012-04-21
8920725508	2012-03-29	8920735359	2012-05-19	8990067064	2012-04-29
8920725692	2012-03-25	8920735395	2012-05-19	8990069558	2012-05-29
8920725926	2012-03-24	8920735549	2012-05-12	9005180317	2012-05-06
8920726149	2012-03-25	8920735606	2012-05-12	9007470667	2012-05-13
8920726403	2012-04-01	8920735682	2012-05-12	9009221859	2012-05-08
8920726403	2012-04-01	8920735979	2012-05-21	9009221871	2012-05-11
8920726624	2012-04-03	8920735982	2012-05-12	9009222113	2012-04-15
8920726797	2012-03-28	8920736257	2012-05-14	9010156960	2012-03-08
8920728044	2012-04-03	8920736555	2012-05-16	9010157041	2012-04-17
8920728308	2012-04-12	8920736682	2012-05-18	9010157042	2012-04-17
8920728727	2012-04-07	8920736845	2012-05-18	9010212117	2012-05-31
8920729163	2012-04-15	8920737194	2012-05-29	9010327071	2012-04-13

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9010797737	2012-04-02	9015247643	2012-05-21	9031451487	2012-04-13
9011350658	2012-03-09	9015247763	2012-05-13	9032423305	2012-05-24
9011620566	2012-04-03	9015247764	2012-05-20	9033625246	2012-04-26
9011620865	2012-04-02	9015247766	2012-05-21	9033625434	2012-05-11
9011679827	2012-05-24	9015264144	2012-03-27	9033625438	2012-05-11
9011709437	2012-04-30	9015399577	2012-05-14	9040635235	2012-04-30
9011896259	2012-03-09	9015780029	2012-04-19	9040691492	2012-04-16
9011896489	2012-04-05	9015846872	2012-04-02	9041682050	2012-04-16
9012836704	2012-04-30	9015935933	2012-05-15	9041682068	2012-05-15
9013369029	2012-03-23	9017329894	2012-03-26	9042133194	2012-05-08
9013499159	2012-05-18	9017331012	2012-03-23	9044960124	2012-05-21
9013874760	2012-04-20	9017525347	2012-03-03	9056231739	2012-05-14
9014068625	2012-04-17	9018554465	2012-03-09	9056752149	2012-03-13
9014728186	2012-05-02	9019065494	2012-05-29	9056781510	2012-03-27
9014984927	2012-03-21	9030053876	2012-04-20	9058270071	2012-04-24
9015245727	2012-03-04	9030541019	2012-04-30	9060092193	2012-03-18
9015245838	2012-03-20	9030541059	2012-05-04	9060093465	2012-03-01
9015245861	2012-04-14	9030620098	2012-04-27	9060103863	2012-04-01
9015246622	2012-03-15	9030690385	2012-04-02	9060108511	2012-04-25
9015246780	2012-04-01	9030692153	2012-04-19	9060109762	2012-04-14
9015246870	2012-04-11	9030693853	2012-05-21	9060110020	2012-04-24
9015246977	2012-03-19	9031238021	2012-05-18	9060110020	2012-04-24
9015247164	2012-03-10	9031251641	2012-03-26	9060111972	2012-05-23
9015247169	2012-03-16	9031451282	2012-03-12	9060113879	2012-05-10
9015247474	2012-05-10	9031451321	2012-03-26		

Anlagen, Teil 14

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: entclc
- Keim2: entclo
- Keim3: entcpx
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw

Labornummer	Archiv
7000086996	2012-03-01
8920721656	2012-03-07
8920725507	2012-03-29
8920726149	2012-03-25
8920734655	2012-05-16
9015247474	2012-05-10
9056781510	2012-03-27

Anlagen, Teil 15

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: entclc
- Keim2: entclo
- Keim3: entcpx
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000086996	2012-03-01	8920731090	2012-04-29	9015247474	2012-05-10
7000089897	2012-03-03	8920734885	2012-05-08	9060092193	2012-03-18
7000106258	2012-05-26	8920738456	2012-05-27	9060110020	2012-04-24
8920730192	2012-04-19				

Anlagen, Teil 16

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: entclc
- Keim2: entclo
- Keim3: entcpx
- Text1: esblpo
- Text2: esblam
- Text3: esblw
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CTX ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: ETP = S
- Antibiotikum5: IMI = S
- Antibiotikum6: MERO = S

Labornummer	Archiv
7000086996	2012-03-01
9015247474	2012-05-10

Anlagen, Teil 17

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: acibau
- Keim2: acibcg
- Keim3: acicba
- Keim4: acijoh
- Keim5: acijun
- Keim6: acilwo
- Keim7: aciurs

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8919015354	2012-03-16	9009970002	2012-05-12	9030986295	2012-04-30
8919015410	2012-03-26	9009970023	2012-05-13	9031448023	2012-05-29
8920710328	2012-03-01	9010241809	2012-05-14	9031451366	2012-04-30
8920723060	2012-03-20	9010280550	2012-05-12	9031451543	2012-04-30
8920724359	2012-03-16	9010526184	2012-03-19	9032403090	2012-04-19
8920724766	2012-03-23	9010740705	2012-05-21	9032561805	2012-04-02
8920724994	2012-03-27	9011491419	2012-05-18	9033625156	2012-04-23
8920725351	2012-03-21	9011491457	2012-05-25	9035039851	2012-05-21
8920725369	2012-03-21	9011896501	2012-04-04	9036117539	2012-04-02
8920726379	2012-03-27	9011896857	2012-05-21	9036117770	2012-05-07
8920727457	2012-04-07	9011925966	2012-03-09	9036117823	2012-05-11
8920728028	2012-04-06	9011955643	2012-05-10	9040792073	2012-03-05
8920732124	2012-04-28	9012035514	2012-04-14	9040792104	2012-03-08
8920733931	2012-05-05	9012472525	2012-03-10	9040792213	2012-04-09
8920734850	2012-05-08	9013904044	2012-04-27	9040792439	2012-05-29
8920734877	2012-05-09	9014068775	2012-05-21	9041192830	2012-04-02
8920734908	2012-05-15	9014661989	2012-04-23	9041192862	2012-05-15
8920735066	2012-05-08	9015246787	2012-03-21	9042133096	2012-04-03
8920735279	2012-05-09	9017055092	2012-04-06	9055091721	2012-03-27
8920735910	2012-05-12	9017525419	2012-03-14	9055940089	2012-03-13
8920736611	2012-05-17	9017526011	2012-05-30	9056762485	2012-05-22
8920737031	2012-05-19	9017682855	2012-03-12	9057322159	2012-03-13
8920737430	2012-05-20	9018554494	2012-03-11	9057712191	2012-04-17
8920737780	2012-05-27	9018554555	2012-03-16	9057790718	2012-03-09
8920737814	2012-05-24	9018555532	2012-05-21	9058322893	2012-03-24
8920737890	2012-05-30	9018555638	2012-05-29	9060100742	2012-03-23
8940370454	2012-05-23	9030074240	2012-05-29	9060100744	2012-03-23
9007940575	2012-05-18	9030875129	2012-03-01	9060103858	2012-03-27
9007970383	2012-05-30				

Anlagen, Teil 18

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: acibau
- Keim2: acibcg
- Keim3: acicba
- Keim4: acijoh
- Keim5: acijun
- Keim6: acilwo
- Keim7: aciurs
- Antibiotikum1: CIP ≠ S
- Antibiotikum2: IMI = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9018554494	2012-03-11	8920735279	2012-05-09	9009970023	2012-05-13
9011955643	2012-05-10	9010241809	2012-05-14	9011491419	2012-05-18
8920735066	2012-05-08	9009970002	2012-05-12	8920737430	2012-05-20

Anlagen, Teil 19

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000089482	2012-05-10	8920723123	2012-03-10	8920727356	2012-04-10
7000090569	2012-03-16	8920723148	2012-03-09	8920727388	2012-03-31
7000092933	2012-03-16	8920723205	2012-03-10	8920727663	2012-03-31
7000093552	2012-03-10	8920723307	2012-03-11	8920727911	2012-04-01
7000093571	2012-03-10	8920723477	2012-03-10	8920728261	2012-04-03
7000093867	2012-04-05	8920723559	2012-03-10	8920728291	2012-04-12
7000093949	2012-04-11	8920723564	2012-03-11	8920728788	2012-04-06
7000094511	2012-03-09	8920723701	2012-03-11	8920729526	2012-04-13
7000094904	2012-04-14	8920724027	2012-03-13	8920729676	2012-04-13
7000095026	2012-04-19	8920724301	2012-03-16	8920729676	2012-04-16
7000095168	2012-04-30	8920724429	2012-03-24	8920729723	2012-04-14
7000097513	2012-04-25	8920724578	2012-03-24	8920729929	2012-04-22
7000097664	2012-05-28	8920724631	2012-03-16	8920729988	2012-04-17
7000098096	2012-05-19	8920724687	2012-03-24	8920730115	2012-04-24
7000098464	2012-05-06	8920724844	2012-03-25	8920730192	2012-04-19
8110033450	2012-05-29	8920724925	2012-03-20	8920730555	2012-04-24
8110033534	2012-05-22	8920725206	2012-03-26	8920730556	2012-04-29
8910253296	2012-04-04	8920725208	2012-03-26	8920730600	2012-04-19
8919015341	2012-03-20	8920725211	2012-03-27	8920730607	2012-04-19
8920710409	2012-03-03	8920725313	2012-03-29	8920730632	2012-04-20
8920710428	2012-03-03	8920725405	2012-03-20	8920730704	2012-04-26
8920710579	2012-03-08	8920725582	2012-04-02	8920730726	2012-04-21
8920710994	2012-03-04	8920725583	2012-03-29	8920731035	2012-04-22
8920721452	2012-03-01	8920725762	2012-03-24	8920731097	2012-04-24
8920721516	2012-03-01	8920725925	2012-03-30	8920731228	2012-04-22
8920721558	2012-03-09	8920725925	2012-03-31	8920731251	2012-04-30
8920721634	2012-03-03	8920725947	2012-04-03	8920732194	2012-04-27
8920721726	2012-03-01	8920725948	2012-04-03	8920732534	2012-04-26
8920722233	2012-03-11	8920725951	2012-03-25	8920732577	2012-04-30
8920722236	2012-03-11	8920725957	2012-03-31	8920732635	2012-04-25
8920722332	2012-03-15	8920726119	2012-03-23	8920732648	2012-04-24
8920722375	2012-03-12	8920726334	2012-03-25	8920732787	2012-05-01
8920722492	2012-03-08	8920726377	2012-03-25	8920732848	2012-05-05
8920722498	2012-03-08	8920726527	2012-03-28	8920732899	2012-04-30
8920722661	2012-03-15	8920726619	2012-03-27	8920733053	2012-04-26
8920722749	2012-03-08	8920726642	2012-04-02	8920733214	2012-04-28
8920722778	2012-03-10	8920726827	2012-03-28	8920733460	2012-04-29
8920722814	2012-03-11	8920726829	2012-04-03	8920733541	2012-04-28
8920722846	2012-03-09	8920726968	2012-04-03	8920734099	2012-05-11
8920722856	2012-03-09	8920727130	2012-04-01	8920734293	2012-05-05
8920722900	2012-03-13	8920727137	2012-03-30	8920734333	2012-05-14
8920722901	2012-03-10	8920727181	2012-04-10	8920734375	2012-05-11

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920734469	2012-05-06	8920738946	2012-05-30	9009222049	2012-04-09
8920734669	2012-05-06	8920738957	2012-05-31	9009222058	2012-04-08
8920734877	2012-05-09	8931074316	2012-03-08	9009521602	2012-05-26
8920734884	2012-05-06	8931074329	2012-03-08	9009970004	2012-05-18
8920734885	2012-05-15	8931074385	2012-03-17	9009970021	2012-04-15
8920734934	2012-05-08	8931074386	2012-03-17	9009970023	2012-05-13
8920734979	2012-05-08	8931074411	2012-03-10	9010063300	2012-04-20
8920734995	2012-05-08	8931074446	2012-03-13	9010063424	2012-03-26
8920735013	2012-05-08	8931074473	2012-03-20	9010063463	2012-03-30
8920735042	2012-05-11	8931074474	2012-03-20	9010173117	2012-03-01
8920735128	2012-05-15	8931074493	2012-03-17	9010239927	2012-03-19
8920735159	2012-05-15	8931074505	2012-03-17	9010280461	2012-03-12
8920735303	2012-05-10	8931074548	2012-03-29	9010409313	2012-04-02
8920735311	2012-05-16	8931074549	2012-03-29	9010536833	2012-05-21
8920735405	2012-05-11	8931074550	2012-03-23	9010565245	2012-05-08
8920735417	2012-05-10	8931074551	2012-03-21	9010740544	2012-04-02
8920735418	2012-05-20	8931074576	2012-03-24	9010740591	2012-04-16
8920735443	2012-05-12	8931074624	2012-03-24	9010740592	2012-04-16
8920735526	2012-05-10	8931074835	2012-04-08	9010983203	2012-05-09
8920735663	2012-05-15	8931074847	2012-04-15	9011263174	2012-04-27
8920735684	2012-05-13	8931074848	2012-04-15	9011340549	2012-03-01
8920736167	2012-05-20	8931074939	2012-04-17	9011340556	2012-04-02
8920736240	2012-05-17	8931074973	2012-04-21	9011350527	2012-03-05
8920736411	2012-05-16	8931074975	2012-04-20	9011370452	2012-03-23
8920736524	2012-05-15	8931075026	2012-04-22	9011370595	2012-04-20
8920736675	2012-05-18	8931075084	2012-05-01	9011420335	2012-05-07
8920736675	2012-05-24	8931075105	2012-05-05	9011490888	2012-03-10
8920736714	2012-05-17	8931075195	2012-05-10	9011491190	2012-04-17
8920736779	2012-05-19	8931075271	2012-05-19	9011491229	2012-04-23
8920736787	2012-05-19	8931075273	2012-05-13	9011491291	2012-04-23
8920736871	2012-05-22	8931075348	2012-05-18	9011500042	2012-04-25
8920736872	2012-05-29	8931075353	2012-05-20	9011520013	2012-04-13
8920737024	2012-05-18	8940055959	2012-05-22	9011587108	2012-05-08
8920737048	2012-05-23	8940571367	2012-04-29	9011620802	2012-03-26
8920737252	2012-05-22	8940782670	2012-04-03	9011679269	2012-03-03
8920737313	2012-05-21	8940971983	2012-03-06	9011679513	2012-04-17
8920737346	2012-05-29	8990062097	2012-03-10	9011819605	2012-03-10
8920737352	2012-05-22	8990062282	2012-03-15	9011896513	2012-04-09
8920737358	2012-05-19	8990062306	2012-03-13	9011896582	2012-04-17
8920737424	2012-05-28	8990062519	2012-03-17	9011896588	2012-04-17
8920737471	2012-05-21	8990063011	2012-03-20	9011896604	2012-04-18
8920737685	2012-05-22	8990063294	2012-03-23	9011896872	2012-05-15
8920737815	2012-05-24	8990066136	2012-04-20	9011998813	2012-05-03
8920737878	2012-05-25	8990066137	2012-04-19	9012035553	2012-04-10
8920737879	2012-05-25	8990067159	2012-04-30	9012275920	2012-04-10
8920737880	2012-05-25	9001481409	2012-05-25	9012805194	2012-04-02
8920737928	2012-05-25	9005180314	2012-05-06	9012805208	2012-03-09
8920738292	2012-05-25	9006216425	2012-03-09	9012847972	2012-04-23
8920738379	2012-05-30	9006222237	2012-05-25	9012864164	2012-04-10
8920738453	2012-05-28	9006242269	2012-04-22	9013524236	2012-04-09
8920738456	2012-05-26	9007541054	2012-05-28	9013659301	2012-05-18
8920738468	2012-05-26	9007940567	2012-05-08	9013705839	2012-04-20
8920738737	2012-05-30	9007970264	2012-03-16	9013844167	2012-03-27
8920738809	2012-05-30	9009221749	2012-03-30	9013844195	2012-04-20

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
9013844201	2012-04-30	9021506634	2012-03-12	9040665143	2012-04-10
9013904023	2012-04-14	9030053557	2012-03-06	9040665151	2012-04-05
9013904039	2012-04-23	9030053615	2012-03-19	9040665153	2012-03-26
9014418586	2012-05-21	9030054291	2012-04-16	9040665157	2012-04-05
9014418587	2012-05-21	9030054425	2012-04-30	9040665179	2012-04-30
9014490865	2012-03-01	9030143661	2012-04-02	9040665181	2012-04-27
9014503251	2012-05-07	9030200011	2012-03-26	9040665184	2012-04-30
9014577554	2012-03-03	9030426879	2012-05-14	9040993569	2012-04-10
9014878049	2012-04-16	9030427436	2012-03-08	9041192851	2012-05-07
9015014917	2012-04-30	9030449695	2012-04-30	9041682069	2012-05-18
9015014918	2012-04-30	9030470434	2012-05-29	9044720448	2012-03-05
9015014919	2012-04-30	9030540859	2012-04-10	9055070179	2012-04-16
9015246731	2012-03-28	9030682295	2012-04-30	9055091884	2012-04-17
9015247241	2012-03-21	9030691004	2012-04-02	9055092155	2012-05-22
9015247337	2012-05-13	9030691086	2012-04-02	9055154009	2012-05-19
9015247662	2012-05-28	9030693601	2012-05-21	9055260959	2012-03-02
9015247734	2012-05-28	9030828850	2012-04-17	9055260962	2012-03-10
9015247751	2012-05-28	9030828851	2012-04-17	9055260964	2012-03-08
9015247797	2012-05-28	9030986234	2012-04-30	9055261017	2012-05-15
9015247799	2012-05-28	9031153847	2012-04-16	9055261029	2012-05-22
9015399627	2012-05-23	9031237986	2012-05-08	9055342866	2012-05-19
9015651448	2012-05-21	9031451277	2012-03-06	9055940091	2012-03-19
9015684079	2012-04-17	9031451312	2012-03-19	9055940101	2012-04-20
9015770021	2012-04-30	9031451339	2012-04-10	9057020033	2012-03-06
9015779611	2012-03-10	9031451486	2012-04-18	9057020034	2012-03-06
9015779613	2012-03-13	9031660688	2012-05-07	9057930200	2012-03-20
9015779945	2012-04-10	9031660692	2012-05-21	9057930222	2012-05-07
9015935852	2012-05-04	9031778556	2012-03-12	9058270067	2012-04-25
9015936020	2012-05-29	9031779112	2012-03-27	9058291498	2012-04-08
9015984049	2012-03-19	9032160903	2012-04-13	9058322908	2012-03-21
9016287473	2012-05-29	9032308421	2012-03-19	9058400030	2012-04-21
9017329733	2012-04-10	9032422584	2012-03-09	9060092125	2012-03-10
9017440553	2012-03-12	9032740841	2012-03-16	9060100678	2012-03-21
9017480189	2012-03-06	9032740870	2012-04-25	9060104210	2012-04-20
9017480190	2012-03-06	9032740883	2012-05-14	9060105277	2012-03-31
9017480293	2012-03-23	9033065163	2012-03-12	9060105377	2012-04-03
9017480382	2012-04-10	9033625156	2012-04-23	9060105449	2012-03-21
9017525347	2012-03-03	9033625163	2012-04-23	9060105497	2012-03-24
9017610037	2012-03-02	9033625565	2012-05-18	9060105736	2012-05-19
9017711101	2012-05-31	9036117346	2012-03-10	9060107285	2012-04-13
9017838426	2012-03-27	9040086801	2012-03-06	9060107805	2012-05-31
9017850583	2012-05-02	9040121980	2012-05-25	9060108634	2012-05-02
9017850610	2012-05-09	9040297648	2012-03-03	9060111140	2012-05-26
9017932680	2012-05-14	9040298331	2012-05-29	9060113289	2012-05-27
9017995602	2012-05-09	9040327398	2012-03-01	9099966029	2012-04-27
9018554509	2012-03-13	9040344712	2012-03-15	9099980226	2012-04-25
9018554528	2012-03-13	9040344795	2012-04-23	9114503253	2012-05-07
9018554551	2012-03-16	9040395650	2012-05-07	9114844414	2012-03-23
9018554628	2012-03-20	9040444573	2012-05-14	9114878387	2012-05-30
9018554799	2012-03-31	9040635105	2012-04-03	9117850583	2012-05-02
9018554919	2012-04-12	9040665124	2012-03-19	9132597188	2012-04-05
9018555033	2012-04-16	9040665126	2012-03-01	9132740883	2012-05-14
9018555449	2012-05-13	9040665131	2012-03-12	9133065697	2012-04-30
9018555605	2012-05-26				

Anlagen, Teil 20

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletp

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920722778	2012-03-10	8920730726	2012-04-21	9017838426	2012-03-27
8920725313	2012-03-29	8920731035	2012-04-22	8920730192	2012-04-19
8920730607	2012-04-19	8920735443	2012-05-12	8920732848	2012-05-05

Anlagen, Teil 21

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletn

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
7000094511	2012-03-09	8931074385	2012-03-17	9010983203	2012-05-09
8910253296	2012-04-04	8931074386	2012-03-17	9011350527	2012-03-05
8920722332	2012-03-15	8931074411	2012-03-10	9011490888	2012-03-10
8920722814	2012-03-11	8931074473	2012-03-20	9011491190	2012-04-17
8920725582	2012-04-02	8931074474	2012-03-20	9012847972	2012-04-23
8920725583	2012-03-29	8931074493	2012-03-17	9013705839	2012-04-20
8920725947	2012-04-03	8931074548	2012-03-29	9014503251	2012-05-07
8920727130	2012-04-01	8931074549	2012-03-29	9017480382	2012-04-10
8920729988	2012-04-17	8931074550	2012-03-23	9017850583	2012-05-02
8920730704	2012-04-26	8931074551	2012-03-21	9017995602	2012-05-09
8920732534	2012-04-26	8931074624	2012-03-24	9030200011	2012-03-26
8920732899	2012-04-30	8931074835	2012-04-08	9031451339	2012-04-10
8920734099	2012-05-11	8931074848	2012-04-15	9031660688	2012-05-07
8920736675	2012-05-18	8931074973	2012-04-21	9033065163	2012-03-12
8920736872	2012-05-29	8931075026	2012-04-22	9036117346	2012-03-10
8920737252	2012-05-22	8931075084	2012-05-01	9040297648	2012-03-03
8920737252	2012-05-22	8931075273	2012-05-13	9040298331	2012-05-29
8920737346	2012-05-29	8940782670	2012-04-03	9055940091	2012-03-19
8920737486	2012-05-23	8990063294	2012-03-23	9117850583	2012-05-02
8920738453	2012-05-28	9006242269	2012-04-22	8931075195	2012-05-10
8920738737	2012-05-30	9009970004	2012-05-18	8931075271	2012-05-19
8920738809	2012-05-30				

Anlagen, Teil 22

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920722778	2012-03-10	8920732848	2012-05-05	8931074549	2012-03-29
8920725313	2012-03-29	8920735443	2012-05-12	8931074848	2012-04-15
8920725582	2012-04-02	8920737252	2012-05-22	8931075084	2012-05-01
8920725583	2012-03-29	8931074385	2012-03-17	8931075273	2012-05-13
8920729988	2012-04-17	8931074386	2012-03-17	9006242269	2012-04-22
8920730192	2012-04-19	8931074473	2012-03-20	9009970004	2012-05-18
8920730607	2012-04-19	8931074474	2012-03-20	9017838426	2012-03-27
8920730726	2012-04-21	8931074548	2012-03-29	9055940091	2012-03-20
8920731035	2012-04-22				

Anlagen, Teil 23

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ = S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920729988	2012-04-18	9010983203	2012-05-09	9031451339	2012-04-10
8931074624	2012-03-24	9011350527	2012-03-05	9031660688	2012-05-07
8931075195	2012-05-10	9013705839	2012-04-20	9117850583	2012-05-02
8931075271	2012-05-19	9030200011	2012-03-26		

Anlagen, Teil 24

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO = S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920723123	2012-03-10	8920736675	2012-05-18	9011340549	2012-03-01
8920726377	2012-03-25	8920737505	2012-05-21	9011520013	2012-04-13
8920729723	2012-04-14	8920738946	2012-05-30	9013844195	2012-04-20
8920729929	2012-04-22	8931074316	2012-03-08	9015779611	2012-03-10
8920730555	2012-04-24	8931075105	2012-05-05	9040665126	2012-03-01
8920732787	2012-05-01	9006216425	2012-03-09	9060092125	2012-03-10

Anlagen, Teil 25

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP = S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv
8910253296	2012-04-04
8920730704	2012-04-26
8920734099	2012-05-11
8920738453	2012-05-28
9040297648	2012-03-03
9040298331	2012-05-29

Anlagen, Teil 26

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletp
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920722778	2012-03-10	8920730607	2012-04-19	8920732848	2012-05-05
8920725313	2012-03-29	8920730726	2012-04-21	8920735443	2012-05-12
8920730192	2012-04-19	8920731035	2012-04-22	9017838426	2012-03-27

Anlagen, Teil 27

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mletn
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920725582	2012-04-02	8931074473	2012-03-20	8931075084	2012-05-01
8920725583	2012-03-29	8931074474	2012-03-20	8931075273	2012-05-13
8920729988	2012-04-17	8931074548	2012-03-29	9006242269	2012-04-22
8920737252	2012-05-22	8931074549	2012-03-29	9009970004	2012-05-18
8931074385	2012-03-17	8931074848	2012-04-15	9055940091	2012-03-20
8931074386	2012-03-17				

Anlagen, Teil 28

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletn
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ = S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv	Labornummer	Archiv
8920729988	2012-04-18	9010983203	2012-05-09	9031451339	2012-04-10
8931074624	2012-03-24	9011350527	2012-03-05	9031660688	2012-05-07
8931075195	2012-05-10	9013705839	2012-04-20	9117850583	2012-05-02
8931075271	2012-05-19	9030200011	2012-03-26		

Anlagen, Teil 29

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletn
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP ≠ S
- Antibiotikum4: MERO = S

Labornummer	Archiv
8920736675	2012-05-18

Anlagen, Teil 30

Ergebnistabelle des Medizinischen Informationssystems von CSMed mit folgenden Suchkriterien:

- Zeitraum: 03/2012 - 05/2012
- Keim1: pseae
- Text1: mbletn
- Antibiotikum1: TZP ≠ S
- Antibiotikum2: CAZ ≠ S
- Antibiotikum3: CIP = S
- Antibiotikum4: MERO ≠ S

Labornummer	Archiv
8910253296	2012-04-04
8920730704	2012-04-26
8920734099	2012-05-11
8920738453	2012-05-28
9040297648	2012-03-03
9040298331	2012-05-29

Anlagen, Teil 31

Keimidentifizierung über MALDI-TOF MS der in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme *Klebsiella pneumoniae* 1, 2, 3, und 4, *Klebsiella oxytoca* 1, 2, 3 und 4, *Enterobacter cloacae* 1, 2, 3, 4, 5 und 6, *Pseudomonas aeruginosa* 1, 2, 3, 4, 5 und 6, und *Acinetobacter* spp. 1 und 2.

Bruker Daltonics MALDI Biotyper Classification Results



Project Info

Project Name: ID-Kontrolle
 Project Description:
 Project Owner: TOF-User@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2012-07-17 08:09:10.764
 Project Analyte Count: 22
 Project Type: RUO (Research Use Only)

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
Klpneu1 (+++)		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.401	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.21
Klpneu2 (+++)		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.497	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.423
Klpneu3 (+++)		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.381	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38
Klpneu4 (+++)		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.383	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.324
Kloxy1 (+++)		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.397	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.206
Kloxy2 (+++)		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.315	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.306
Kloxy3 (+++)		<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.399	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.16

Kloxy4 (+++)		Klebsiella oxytoca	2.337	Klebsiella oxytoca	2.099
Eclo1 (+++)		Enterobacter cloacae	2.367	Enterobacter cloacae	2.335
Eclo2 (++)		Enterobacter cloacae	2.198	Enterobacter cloacae	2.091
Eclo3 (++)		Enterobacter cloacae	2.244	Enterobacter cloacae	2.107
Eclo4 (++)		Enterobacter cloacae	2.279	Enterobacter cloacae	2.237
Eclo5 (++)		Enterobacter cloacae	2.272	Enterobacter cloacae	2.184
Eclo6 (++)		Enterobacter cloacae	2.26	Enterobacter cloacae	2.124
Pse aer1 (++)		Pseudomonas aeruginosa	2.207	Pseudomonas aeruginosa	2.038
Pse aer2 (+++)		Pseudomonas aeruginosa	2.355	Pseudomonas aeruginosa	2.042
Pse aer3 (+++)		Pseudomonas aeruginosa	2.3	Pseudomonas aeruginosa	2.031
Pse aer4 (++)		Pseudomonas aeruginosa	2.255	Pseudomonas aeruginosa	2.25
Pse aer5 (++)		Pseudomonas aeruginosa	2.257	Pseudomonas aeruginosa	2.045
Pse aer6 (++)		Pseudomonas aeruginosa	2.195	Pseudomonas aeruginosa	2.072
Aci1 (+)		Acinetobacter genomospecies_13	1.953	Acinetobacter baumannii	1.834
Aci2 (++)		Acinetobacter baumannii	2.222	Acinetobacter baumannii	2.172

Anlagen, Teil 32

Keimidentifizierung über MALDI-TOF MS des in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstamm *Enterobacter cloacae* 7.

Bruker Daltonics MALDI Biotyper Classification Results



Project Info

Project Name: **Eclo7**
 Project Description:
 Project Owner: TOF-User@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2012-07-23 11:12:43.218
 Project Analyte Count: 1
 Project Type: RUO (Research Use Only)

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E. cloacae 7 (++)		Enterobacter cloacae	2.158	Enterobacter cloacae	2.144

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, den 24.08.2012